

⑩ 日本国特許庁 (JP)
 ⑪ 特許出願公表
 ⑫ 公表特許公報 (A)

平2-503094

⑬ Int. Cl.⁵
 C 08 B 37/00
 A 61 K 7/00

識別記号
 Q
 J
 K

序内整理番号
 7019-4C
 8413-4C
 8413-4C※

審査請求 未請求
 予備審査請求 未請求

部門(区分) 3 (3)

(全 33 頁)

⑭ 発明の名称 アロエ製品の製造方法

⑮ 特 願 平1-502244
 ⑯ ⑰ 出 願 平1(1989)1月12日

⑮ 国説文提出日 平1(1989)9月14日

⑯ 国際出願 PCT/US89/00036

⑯ 國際公開番号 WO89/06539

⑯ 國際公開日 平1(1989)7月27日

優先権主張 ⑭ 1988年1月14日 ⑮ 米国(US)⑯ 144,872

⑭ 発明者 マツカナレイ ビル エツチ。 アメリカ合衆国。 テキサス 75052, グランドブレーリー チョーグ コート 4602

⑮ 出願人 カーリントン ラボラトリーズ アメリカ合衆国。 テキサス 75062, アービング, イースト ロツシエル ボウルバード 1300

⑯ 代理人 弁理士 松井 光夫

⑭ 指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), S E(広域特許), S U

最終頁に統く

請求の範囲

1. アロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法において：

- a) 可溶化物を有するアロエジュースを得ること；
- b) 前記アロエジュースのpHを約3.00～約3.50に調整すること；
- c) アロエジュースに、水溶性低級脂肪族活性溶媒を添加して活性化学物質を析出させ、それにより不均一溶液を形成させること；
- d) 不均一溶液から、水溶性低級脂肪族活性溶媒および可溶化物を除去して析出した活性化学物質を単離すること；および
- e) 析出した活性化学物質を乾燥することを含む方法。

2. 前記アロエジュースが、

- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して、実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 前記洗浄した葉から、少なくとも第1の端部を除去すること；
- c) 前記の切断し洗浄した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、採集すること；
- d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルフィレットを製造すること；および
- e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲ

ル フィレットを挽きそして均質化して、実質的にアントラキノンを含まない、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

3. 前記アロエジュースが、

- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 洗浄したアロエの葉を碎くこと；および
- c) 碎いた葉を透析して、碎いた葉の残存固分から実質的にアントラキノンを含まないゲルを化学的に取出し分離すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

4. 前記アロエジュースが、

- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 洗浄したアロエの葉を碎くこと；および
- c) 前記碎いたアロエ葉を挽きそして均質化して、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

5. 前記アロエジュースが、

- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して表面の汚れとバクテリアを実質的に除去すること；

表平2-503094(2)

- b) 前記洗浄したアロエの葉を挽くこと；

c) 前記の挽いたアロエの葉を沪過して、繊維状物質を除去すること；および

d) 前記の挽いたアロエの葉を均質化して、アントラキノンに富む、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

6. 前記アロエジュースが、

a) アロエ植物の葉を碎いて、可溶化物を有するアロエジュースを押し出すこと

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

7. 前記アロエジュースが、

a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して表面的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；

b) 前記葉から外皮を除去して、アロエ ゲル フィレットを製造すること；および

c) 前記アロエゲルフィレットを挽きそして均質化して、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること

により得られる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

8. 前記析出物が照射され、それによって前記活性化学物質が殺菌され、保存される請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

9. 前記水溶性低級脂肪族極性溶媒4体積を、アロエジュース1体積に添加して前記活性化学物質を析出させる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

10. 前記水溶性低級脂肪族極性溶媒が、メタノール、エタノールおよびプロパンノールからなる群より選ばれる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

11. 前記水溶性低級脂肪族極性溶媒が、エタノールである請求項10記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

12. 前記水溶性低級脂肪族極性溶媒が除去される前に、前記活性化学物質が前記水溶性低級脂肪族極性溶媒およびアロエジュースから約4時間析出せしめられる請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

13. 前記の析出した活性化学物質が、凍結乾燥により乾燥される請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化学物質を抽出する方法。

14. 1) 析出した活性化学物質をリン酸塩緩衝液に再溶解させること；

a) 再溶解された、析出した活性化学物質を、非特異的プロテアーゼで処理し、次いで広範な透析を行うこと；および

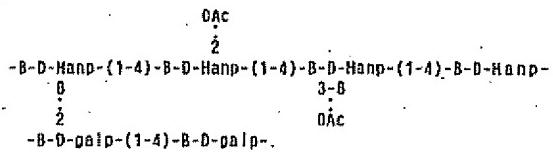
b) 非沪過性生成物を凍結乾燥すること

からなる段階をさらに含む請求項1記載のアロエ植物の葉からアロエ植物における活性化蓄積質を抽出する方法。

15. 請求項1の方法により製造した生成物。
 16. 請求項2の方法により製造した生成物。
 17. 請求項3の方法により製造した生成物。
 18. 請求項4の方法により製造した生成物。
 19. 請求項5の方法により製造した生成物。
 20. 請求項6の方法により製造した生成物。
 21. 請求項7の方法により製造した生成物。
 22. 請求項8の方法により製造した生成物。
 23. 請求項9の方法により製造した生成物。
 24. 請求項10の方法により製造した生成物。
 25. 請求項11の方法により製造した生成物。
 26. 請求項12の方法により製造した生成物。
 27. 請求項13の方法により製造した生成物。
 28. 請求項14の方法により製造した生成物。
 29. 無秩序に散在したアセチル基が、酸素原子を介してポリマーに結合しており、かつD-ガラクトピラノースが、70モノマー単位当たり約1つのD-ガラクトピラノース残基の比で α (2-6)結合を介してポリマー結合しているところの、線状 β (1-4)-D-マンノシル単位からなる実質的に非分解性の凍結乾燥したポリマーを含む組成物。
 30. 前記ポリマーがガンマ線またはマイクロ波で照射される請求項29記載の組成物。
 31. アセチル化の程度が、モノマー当たり約0.8アセチル

蓋である請求項29記載の組成物。

32.



を含む繰り返しモノマーを有し、ここでアセチル化の程度がポリマーのモノマー当たり0.8アセチル基であり、ガラクトピラノース単位が70モノマー単位当たり約1の比でポリマーに結合しており、マンノースのガラクトースに対する比が約20:1である、実質的に非分解性の環状低聚糖した継状ポリマーを含む組成物。

引月 素田 吾

アロエ製品の製造方法

関連出願

本出願は、米国出願シリアル番号809,261号の一部継続であり、その全内容および開示がここで参考として具体的に組み込まれる。前記米国出願シリアル番号809,261号は、1985年6月20日に出願され、1987年1月15日に国際公開番号WO 87/00052のもとに公開された国際出願番号PCT/US88/01885号に対応しており、その全内容および開示もまたここに参考として具体的に組み込まれる。前記米国出願シリアル番号809,261号は、1985年12月17日に出願された米国出願シリアル番号810,025号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1985年7月12日に出願された米国出願シリアル番号754,859号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1985年6月28日に出願された米国出願シリアル番号750,321号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1984年9月12日に出願された米国出願シリアル番号849,967号（現在、放棄された）の一部継続であり、これは1982年5月7日に出願された米国出願シリアル番号875,720号（現在、放棄された）の一部継続である。前記シリアル番号809,261号は、アロエ製品の製造方法、それにより得られた製品およびその粗成物とい

う表題のものである。前記シリアル番号810,025号はアロエ製品の製造方法および該方法によって得られた製品という表題のものである。前記シリアル番号754,859号、750,321号、849,967号および875,720号はアロエベラ（*Aloe Vera*）製品の製造方法という表題のものである。

発明の背景

1. 発明の分野

この発明はアロエ植物を処理し、この植物の一部を取り出して局所用ならびに内服用の粗成物に処理する技術ならびにこのアロエの部分を含む粗成物に関する。

2. 従来技術の説明およびその他の情報

アロエベラは広く信じられていたようなサボテン植物ではなく、むしろユリ科の仲間である。約800種のアロエ植物が知られている。ハーディング、アロエズ オブ ザ ワールド（*Aloes of the World*）：ア チェックリスト インデックス アンド コード（*A Checklist, index and code*），エクセルサ9（*Excelsa 9*）：57-04（1970）がある。それらは暑い乾燥した地方に生育するようであり、地中海、中東、アフリカ、中国、日本、メキシコおよびアメリカ合衆国南部から広く散在している。その医薬特性のために用いられるいくつかの重要な種に、アロエ バルバデンシス ミラー（*Aloe barbadensis Miller*）（アロエベラ）、A. アルボレッセンス（*A. arborescens*）、A. ブリカチリス（*A. plicatilis*）、A. パホンベ（*A. vaohexba*）、A. サボナリア（*A. saponaria*）、

A. アフリカーナ（*A. africana*）、A. フェロックス（*A. ferox*）およびアロエ ペリイ（*Aloe perrii*）がある。レイノルズ アロエズ オブ トロピカル アフリカ アンド マダガスカル（*Aloes of Tropical Africa and Madagascar*）、ザ ト拉斯ティーズ（*The Trustees*）、アロエ記録基金（*The Aloe Book Fund*）、ババネ スワジラント（*Hhlabane Swaziland*）。しかし、A. バルバデンシスミラーは、広く用いられ、いわれるところの最も効果的な治療力のため、「真のアロエ」として一般的に認められているが、日本ではA. アルボレッセンス ミラー（*A. arborescens Miller*）が胃腸疾患から水虫までの範囲にわたる種々の病気のための民間治療薬として、伝統的に用いられてきた。

アロエベラは、ロゼット構造で茎に結合しているふくらんだ様の葉を持つ多年生植物である。成熟した植物の葉は縁に沿ってのこぎり様の鋭い先を持ち、長さ25インチより大きくなりうる。

第1図および第2図に示したように葉を横断的に切ると、厚いクチクラで覆われた表皮3の外壁が見える。表皮3の下に、柔組織として知られている葉緑粗組織細胞とより薄い壁で仕切られた細胞とに区別される葉肉がある。葉粗組織細胞は透明な粘液質のジェリー1を収容する。内に維管束細胞を有する維管束2は根下剤特性を有する黄色の液汁を含み、また2つの主な細胞には含まれている。植物細胞で代謝副産物として生成されるショウ酸カルシウムの針状結

晶が、葉の中央部分で主に見つかる。

アロエベラは2つの主な液漿、すなわち黄色のラテックス（済出液）と透明ゲル（粘液）を含んでいる。アロエバルバデンシスミラーの葉の乾燥させた済出液をアロエという。商業的名称はクラカオアロエ（*Curaçao aloe*）である。それは主としてアロイン、アロエ・エモジンおよびフェノールからなる。ブルース（*Bruce*）、サウス アフリカン メディカル ジャーナル（*South African Medical Journal*），41: 984（1967）；モロー（*Marrow*）ら、アーキ グーマトロジー（*Arch. Dermatology*），116: 1064-1065（1980）；サレク（*Salek*）ら、コロージョン プリベンション&コントロール（*Corrosion Prevention & Control*），9-10（1983）；マップ（*Happ*）ら、プランタメディカ（*Planta Medica*），18: 361-365（1970）；ランワルド（*Ranwald*）、アーキ フーマコロジー（*Arch. Pharmacology*），315: 477-478（1982）。アントラキノン類およびそのグリコシド類を含む多くのフェノール類が、薬理的に活性であることが知られている。ブルース（*Bruce*）、エクセルサ（*Excelsa*）5: 57-68（1975）；スガ（*Suga*）ら、コズメティック アンド トイレタリーズ（*Cosmetic and Toiletries*），58: 105-108（1983）。

その植物の柔組織細胞からの粘液質のジェリーをアロエベラゲルという。ゲルが不適当な処理技術によって汚染されなければ、分解したり、ゲルの変色の原因となるアン

トラキノンは通常存在しない。

アロエ ベラ ゲルは、約98.5重量%水である。全固形分の60%より多くが炭水化物起源のポリサッカライドからできている。有機酸および無機化合物、特にシウ酸カルシウムが固形分の残余を成す。

アロエ植物の葉全部、滲出液および新鮮なゲルが、人間の種々の苦痛のために用いられてきた。医薬の治療薬としてそれを使用した証拠は、紀元前400年のエジプト人にさかのぼることができる。アロエ ベラはまた死体に防腐保藏処理を施し、かつ死を引き起こすものから死体の防腐保藏処理者を保護するために用いられた。他の初期の文明はアロエ ベラを、皮膚の手入れ、虫に刺されたりくわれたりした傷の手当て、かき傷の処置、傷の治療、髪が失なわれたときのためや下剤として、また漢瘍化した皮膚のために用いられた。それは驅虫剤として、下剤として、健胃剤として、多くの文化の伝統的な源であり、そしてとりわけ創病、火傷およびアレルギー性の病気のために用いられた。コール(cole)ら、アーキップス オブ ダーマトロジー アンド シフィロロジー (Archives of Dermatology and Syphilology), 47: 250(1943); コブラ(Chopra)ら、グロサリー オブ インディアン メディシナル プランツ (Glossary of Indian Medicinal Plants), カウンシル オブ サイエンティフィック アンド インダストリアル リサーチ (Council of Scientific and Industrial Research), ニュー デリー (New Delhi); シップ(Ship),

ジャーナル オブ アメリカン メディカル アソシエーション (Journal of American Medical Association), 288: 1770 - 1772(1977); モートン (Morton), アトラス オブ メディカル プランツ オブ ミドル アメリカン バハマズ トウ ユカタン (Atlas of Medical Plants of Middle American Bahamas to Yucatan), チャールズ C. トマス E.D. (Charles C. Thomas ED.), 78 - 80(1981); ディーズ・マーチンズ (Diaz-Martinez), ラ ザビラ (La Zabila), コミニニカド No. 46 ソブレ レクルソス ピオティコス ポテンシャレス デル パイス (Comunicado No. 46 Sobre Recursos Bióticos Potenciales del País), I N I R E B, メキシコ (Mexico) (1981); ダスツール (Dastur), メディシナル プランツ オブ インディア アンド パキスタン (Medicinal Plants of India and Pakistan); D. B. タラボレバラ サンズ (Taraorovala Sons) & Co., プライベート (Private) Ltd., ボンベイ (Bombay) 18 - 17 (1982)。

アロエ ベラは、「医薬」または「治療性」を持つとして衆人の支持 (lay acceptance) の長い歴史を享受してきた。最近数年にわたって、科学的基礎を擴大した多くの本や論文が、アロエ ベラについて書かれてきた。アロエ ベラ会議 (Aloe Vera Council) のような組織および公認された医学会が医者、歯科および他の科学者の発表や事例史を通して「アロエ現象」を信じてきた。アロエ ベラは皮

膚科学、特に放射線に原因する皮膚病の治療の領域において広く重要な役割を演じてきた。マッキー (Hackee), X-レイ アンド ラジウム イン ザ トリートメント オブ ティザーズ オブ ザ スキン (X-Rays and Radium in the Treatment of Diseases of the Skin), 第3版, リー アンド フェビガー (Lee and Febiger), フィラデルフィア (Philadelphia), 819 - 820(1908); ロバルティ (Rovalti) ら, インダストリアル メディシン アンド サージェリー (Industrial Medicine and Surgery), 28: 384 - 388(1966); ザワリー (Zavahry) ら, クオテーションズ フロム メディカル ジャーナルズ オン アロエ リサーチ (Quotations From Medical Journals on Aloe Research), 編集マックス (Max) B. スコーセン (Skousen), アロエ ベラ リサーチ インスティチュート (Aloe Vera Research Institute), シプレス (Cypress), カリフォルニア (California), 18 - 28 (1977); セラ (Cora) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン アニマル ホスピタル アソシエーション (Journal of the American Animal Hospital Association), 18: 883 - 888(1982)。致ウイルス剤、致菌剤および防カビ剤として消化系統の問題における、また婦人科学的病気における医学的適用について記録した一連の科学文献は広範囲であり、グリンドリー (Grindley) とレイノルズ (Reynolds) により、十分に概説された [ジャーナル オブ エトノファーマコロジー (Journal of Ethnopharmacology),

18: 117 - 151 (1986)]。

アロエにおいて見出された化学品の重要性はまた、それらが誰にも知られている固定病局方に載せられてきたという事実により示される。U. S. ファーマコペイア (U. S. Pharmacopoeia), 第20改訂版, ザ ナショナル フォーミュラリー (The National Formulary), 第14版, エナイティッド ステイツ ファーマコペイアル コンベンション (United States Pharmacopeial Convention), Inc., ロックビル (Rockville), メリーランド, 1980年7月1日。しかし、U. S. ファーマコペイアはアロエの黄色の液汁の薬効部について述べているが、粘液については述べていない。新鮮な保存されていないゲルは約98.5~99.2%が水である。水を除去した後に残っている全固形分は0.8から1.5%の範囲にある。固形分の主な構成成分は、粘液、糖、維維、タンパク質、灰分、脂肪、アロインおよび樹脂を含む。ロブソン (Robson) ら, ジャーナル オブ バーン ケア リハビリテーション (Journal of Burn Care Rehabilitation), 3: 157 - 163(1982)。酵素、有機酸、無機塩、アミノ酸およびアルカリイドを含む組成物の報告がなされている。ロウ (Rowe) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ファーマシーティカル アソシエーション (Journal of the American Pharmaceutical Association), 30: 282~288(1941); ロボツ (Roboz) ら, ジャーナル オブ ジ アメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society),

特表平2-503094(5)

70: 3248 - 3249(1948) ; ウォーラー (Walter) ら、ブロシーディングズ オブ オクラホマ アカデミー オブサイエンス (Proceedings of Oklahoma Academy of Science) , 58: 69 - 78(1978)。いかにして糸を処理するかに依存して、粘液と糖が脱水したゲルの主成分である。みつかった糖は、ガラクトース、グルコース、マンノース、ラムノース、キシロースおよびウロン酸である。相反する報告が見られるが、粘液は主にマンナンとグルコマンナンからなる。エベレンデュ (Eberendu) ら、ザケミカル キャラクタリゼーション オブ キアリシン (The Chemical Characterization of Carrisyn (登録商標)) (調製) ; マンダル (Mandal) ら、カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research) , 87: 249 - 258 (1980b); ロボツ (Roboz) ら、ジャーナル オブ ジアメリカン ケミカル ソサエティ (Journal of the American Chemical Society) , 70: 3248 - 3249(1948); ゴーダ (Gowda) ら、カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research) , 72: 201 - 205(1979) ; セガル (Segal) ら、ロイディア (Lloydia) , 31: 423 (1988)。

現在、アロエ ベラにおける活性物質の同一性に関する論争は静まっていない。それ故に、ゲルに依存する成分と渗出液に見出された成分を明確に区別することが重要である。ゲルの比較的多い部分は、少量の種々の他の化合物を含む主としてポリサッカライド質の粘液である。観察され

る活性のいくつかにおいて、ポリサッカライド主成分と他の成分との間の何らかの相乗作用(synergistic action)がありうると考えられる。ロイントン (Leung)、エクセルサ (Excelsa) , 8: 65 - 68(1978); ヘンリー (Henry)、コズメティック アンド トイレtries (Cosmetic and Toiletries) , 94: 42 - 50(1979)。例えは、傷の治療に効果的な成分は、傷痕酸(tramatic acid) (フレイタグ (Freytag)、ファーマツィー (Pharmazie) , 9: 705 (1954)) お上げポリサッカライドの一種でありうることが数人の研究者によって報告されている。カワシマ (Kawashima) ら、ケミカル アブストラクツ (Chemical Abstracts) , 93: 13075(1979)。上記のマッキー (Hackee) は、ゲル(外皮や渗出液ではなく)は、放射線火薬の治療に有益な効果の原因となることを記し、そして彼は効果的な治療のために新鮮な糸を用いることの重要性を強調した。ポリサッカライドは、時間とともに分解する。そしてある分子量サイズが特定の薬理学的応答を引き出すのに必要とされうる。ゴトウ (Goto) ら、ガン (Gann) , 53: 371 - 374(1972)。

他の成分からの公知の相乗作用的助力なしに薬理学的および生理学的活性を示すポリサッカライドについて多くの例が文献にある。オオノ (Ohno) ら、ケム ファーム ブル (Chem. Pharm. Bull.) , 33: 2564 - 2568(1985); リーボビシ (Leibovici) ら、ケム バイオル インターラクションズ (Chem. Biol. Interactions) , 80: 191 - 200

(1988); ウカイ (Ukai) ら、ケム ファーム ブル (Chem. Pharm. Bull.) , 31: 741 - 744(1983); リーボビシ (Leibovici) ら、アンチキャンサー リサーチ (Anticancer Research) , 5: 553 - 558(1985)。一般母集団における、特に血統的なコレステロール過多血症(hypercholesterolemia)における脂肪過多血症(hyperlipidemia)は冠状動脈の心臓病および死と関連づけられる。食物繊維の摂取量が高い国では、アテローム性動脈硬化症の発現は一般的ではない。トロウェル (Trowell) ら編集、リファインド カーボハイドレート フード アンド ディジーズ (Refined Carbohydrate Foods and Disease) , ロンドン (London), アカデミック プレス (Academic Press), 207(1975)。ベクチンおよびグラーは、正常者および脂肪過多血症患者においてコレステロールを低くすることが報告されている。ケイ (Kay) ら、アメリカン ジャーナル オブ クリニカル ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition) , 30: 171 - 175(1977)。ハリエンジュの豆(Locust bean)のガムは、マンノースとガラクトースからなるポリサッカライドであり、これは正常者および血統的コレステロール過多血症の人の場合にリボタンパクコレステロールレベルを減少させた。ザボラル (Zavoral) ら、アメリカン ジャーナル オブ クリニカル ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition) , 38: 285 - 294 (1983)。炭水化物食にグアーガムを添加すると、正常

者および糖尿病の人の両方において、食後のグルコースの上昇を抑えた。ジェンキンズ (Jenkins) ら、ランセット (Lancet) , 2: 779 - 780(1977)。クール (Kuhl) らは、グアーガムが妊娠しているインシュリン依存糖尿病患者の血糖制御を示すことを証明した [ダイアビーツ ケア (Diabetes Care) , 6: (2) : 152 - 154(1983)]。

ポリサッカライドの抗腫瘍活性は広く報告されている。レンティヌス シアチフォルミス (Lentinus cynthiphilus) から調製したポリサッカライドは、腫瘍に対して宿主防御を増加させることが知られている。レティ (Rethy) ら、アヌアルス オブ イムノロジー ハンガリー (Annals of Immunology Hungary) , 21: 285 - 290(1981)。ウイルスや腫瘍の侵入に対しての高程度の宿主防御活性を引き出す、マッシュルーム、イースト又はバクテリア抽出物由来のポリサッカライドについていくつかの報告がある。チハラ (Chihara) ら、ネイチャー (Nature) , 222: 687(1969); シュワルツマン (Schwartzman)、プロク ゾク イクスペ バイオル メッド (Proc. Soc. Exper. Biol. Med.) , 29: 737 (1932); レティ (Rethy)、エックス インターナショナル コングレス オブ ミクロバイオロジー: モスクワ (X International Congress of Microbiology; Moscow) , 642(1956)。スズキ (Suzuki) らはまた、菌類、グリフォラ フロンドサ (Grifola frondosa) の培養した子実体 (fruiting bodies) から抽出したポリサッカライド画分の

特表平2-503094(6)

抗腫瘍活性について報告した〔ジャーナル オブ ファーム ディン (Journal of Pharm. Dyn.) , 7: 492 - 500 (1984)〕。固分 (GF - 1) は、腹腔内 (I P) 、静脈内 (I V) および腎瘍内 (I T) 投与した時に、より高い阻害活性の等値レベルを示した。しかし、経口投与 (P O) は効果的でないことが報告された。GF - 1 はまた、マウスでメタ (Hoth) A 細胞肉腫およびMM45癌の固体形に対して、抗腫瘍活性を示した。レンチナン (lentinan) は GF - 1 に似た 6 - 分枝 B - 1 - 3 - 結合グルカンであり、これはメタ A 細胞肉腫に対して効果がない。チホラ (Chihora) 、抗腫瘍ポリサッカライド レンチナン：結論：「宿主防衛機構の操作 (Manipulation of Host Defense Mechanism)」；アオキ (Aoki) ら編、エクセプタ メディカ (Excerpta Medica) 、北オランダ、1 - 16 (1981)；ササキ (Sasaki) ら、カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research) , 47: 99 - 104 (1976)。合成した分枝ポリサッカライドは腫瘍に対して生物活性を示すことが報告された。マツザキ (Hatsuzaki) ら、マクロモルケム (Hakromol. Chem.) , 186: 449 (1985)。マツザキ (Hatsuzaki) らは、著しい活性を示す、アイボリーナット (Ivory nut) マンナン由来の分枝ポリサッカライドである。B - (1 - 4) - D - マンノピラノースおよび B - (1 - 4) - 結合グルコマンナンを合成した〔マクロモルケム (Hakromol. Chem.) , 187: 325 - 331 (1986)〕。ディクチオフォリア インドウシアタ

フィッシュ (Dictyophoridium Industans Fisch) の子实体から抽出した、部分的にアセチル化された線状 B - (1 - 3) - D - マンナンは抗腫瘍活性を示した。ハラ (Hara) ら、カーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research) , 149: 111 (1982)。B - (1 - 3) - グルカンタイプのポリマーは、B - (1 - 4) - グルカンおよびヘミセルロース性ポリマーより高い抗腫瘍活性を示すので、抗腫瘍活性はポリマー主鎖の種類およびその重合の程度に依存するようである。マツザキ (Hatsuzaki) ら、マクロモルケム (Hakromol. Chem.) , 187: 325 - 331 (1986)。細菌の培養液過濾から得た B - (1 - 3) - グルカンのカルボキシメチル化誘導体は、確立されたサルコマ 180 腫瘍から、膀胱体の注入後 2 時間以内に重大な細胞損失を引き起こした。ババ (Baba) ら、ジャー オブ イムノファーマコロジー (J. of Immunopharmacology) , 8: 509 - 572 (1980)。同じ著者は、その物質の注入による、多形核白血球での代償的増加を観察した。ところで、ベスタチン (bestatin) は、免疫調節および抗腫瘍活性を持つことが知られているジペプチドであり〔イシズカ (Ishizuka) ら、ジャーナル オブ アンチバイオティックス (Journal of Antibiotics) , 32: 842 - 852 (1980)〕、これは腫瘍発生にも多形核白血球の数にも影響を及ぼさなかった。ババ (Baba) ら、上記。

ヘパライン (heparin) [ジョレス (Jolles) ら、アクタユニバーサル イント キャンサー (Acta Univ. Int. Cancer) ,

16: 682 - 685 (1980) ; スエマス (Suemasu) ら、ガン (Gann) , 61: 125 - 130 (1970)], 硫酸塩化したラミナラン (laminaran) およびテキストランを含む硫酸塩化したポリサッカライドの抗腫瘍効果について多くの報告がある。ジョレス (Jolles) ら、ブリティッシュ ジャーナル オブ キャンサー (British Journal of Cancer) , 47: 109 - 115 (1983)。ヤマモト (Yamamoto) らは、さらに硫酸塩化することにより、フコイダン (fucoidan) 固分の抗腫瘍活性を高めることを報告した〔ジャパン ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン (Japan Journal of Experimental Medicine) , 54: 143 - 151 (1984)〕。硫酸塩化した生成物は L - 1210 白血病に対する活性を示した。著者らは、抗腫瘍活性の機構は部分的に、腫瘍細胞と中皮細胞 (mesothelial cell) との間の電気的反応作用から生じる L - 1210 細胞の侵入生長の阻害によるものでありうると仮定した。ヤマモト (Yamamoto) ら、上記。硫酸基を持つポリサッカライドはまた、ヒトの T 細胞サイトシン (cytogen) およびネズミ科のポリクローナル B 細胞活性化剤であることが報告されている。スガワラ (Sugawara) ら、ミクロバイオロジカル イムノロジー (Microbiological Immunology) , 28: 831 - 839 (1984)。一般に、硫酸基を有する高分子量のホモポリサッカライドはこれらの特性を持っている。ドリーズ (Dorries) ら、ヨーロピアン ジャーナル オブ イムノロジー (European Journal of Immunology) , 4: (19) ;

スガワラ (Sugawara) ら、セル イムノロジー (Cell Immunology) , 74: 162 - 171 (1982)。

イーストのサッカロマイセス セルビシエ (Saccharomyces cerevisiae) から抽出したグルカンは細胞および体液性免疫を調節するものであることが報告された。ウーレス (Woolies) ら、サイエンス (Science) , 142: 1078 - 1080 (1963)。ポリサッカライドはまた、ネズミ科の多能性造血幹細胞、顆粒球・マクロファージ・コロニー形成細胞および骨髓性および赤血球コロニー形成細胞の増殖を刺激した。ポスピシル (Pospischil) ら、エクスペリエンティア (Experientia) , 30: 1232 - 1234 (1982); ブルガレタ (Burgaleta) ら、キャンサー リサーチ (Cancer Research) , 37: 1739 - 1742 (1977)。マイシン (Malsin) らはまた、X 線にさらされることに対するネズミ科の造血幹細胞の保護を引き起こし、それによってそのようにさらされたマウスの死亡率を減少させる、ポリサッカライドの IV 投与を報告した〔ラジエーション リサーチ (Radiation Research) , 105: 276 - 281 (1986)〕。

セルジェリッド (Seljelid) らは、不溶性またはゲル形成性グリカンがインビトロ (*In vitro*) でマクロファージを活性化し、一方対応する可溶性のグリカンは活性化しないことを観察した〔エクスペリメンタル セル リサーチ (Experimental Cell Research) , 131: 121 (1981)〕。彼らは、グリカンが単核細胞に提示される方法が活性化のために決定的であると仮定した。ボグワルド (Bogwald)

特表平2-503094(フ)

らは、インピトロでマクロファージに刺激的効果を持つグリカンを固定した〔スカンド ジャーナル オブ イムノロジー (Scand. Journal of Immunology) , 20: 355 - 360(1984)〕。これにより若者らは、グリカンの固定したまたは立体的配置の程度がインピトロでのマクロファージへの効果に決定的であると信じることとなった。カンジダアルビカンス (*Candida albicans*) から単離した精製ポリサッカライドは人間の末梢血液リンパ球によりインピトロでの抗体応答を引き起した。ウィルツ (Hirz) ら、クリニカル イムノロジー アンド イムノパソロジー (Clinical Immunology and Immunopathology) , 33: 199 - 209(1984)。正常およびカンジダ感染個体の血清中の抗カンジダ抗体の間には著しい差があった。ウィルツ (Hirz) , 上記。

ポリサッカライドおよびペプチドに結合したポリサッカライドの抗ウイルス活性が観察された。スズキ (Suzuki) ら、ジャーナル アンチバイオティックス (Journal Antibiotics) , 32: 1336 - 1345(1979)。上記のスズキらはレンティヌス エドデス (*Lentinus edodes*) の培養菌糸体から抽出したペプチドマンナン (KS - 2) の抗ウイルス作用を報告した。経口 (PO) 投与および腹腔内 (IP) 投与のいずれも、ウイルス感染に対してマウスを保護する最大血清インターフェロン力値を増加させる結果となった。これは、マウスに静脈内 (IV) または腹腔内 (IP) 投与した場合のみインターフェロンのより高い力値を引

き起こすデキストランホスフェート (DP - 40) [スズキ (Suzuki) ら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 149: 1009 - 1075(1975)] および 9 - メチルストレプトイミドン (9 - MS) [サイトウ (Saito) ら、アンチミア エージェント及ケモセラピー (Antimier Agent & Chemotherapy) , 10: 14 - 19 (1970)] とは異っていた。

アロエ ベラ ゲルの抗炎症活性は、口頭の証言および尊重されている科学雑誌の両方により広く報告されてきた。ルベル (Ruble) は、アロエ ゲルの抗炎症効果の可能な機構について十分論じた (コスメティックス アンド トイレタリーズ (Cosmetics and Toiletries) , 98: 109 - 114(1988))。ウカイ (Ukai) らは、いくつかの植物の子実体から抽出したポリサッカライドにおける抗炎症活性に注目した (ジー ファーマコロジー ディン (J. Pharmacology Dyn.) , 6: 983 - 980(1988))。ポリサッカライドは、浮腫を引き起こすカラギーナンでの著しい阻害効果を証明した。ポリマーの 1 つである O - アセチル化 - D - マンナン (T - 2 - HN) は、さらに、フェニルブタゾンより火傷の発癢過敏症におけるより頗る強阻害効果を証明した。ウカイ (Ukai) ら、上記。ポリサッカライドがタンパク質および脂質から遊離していると言われる事実は、抗炎症効果がアセチル化されたマンナンのみによることを強く示唆している。他の研究者達はまた、複合ポリサッカライド (サエキ (Saeki) ら、ジャパン ファー

マコロジー (Japan J. Pharmacology) , 24: 109 - 118(1974)]、グリコプロテイン [アリタ (Arita) ら、ジー ファーマコロジー (J. Pharmacology) , 24: 861 - 889(1974)] および硫酸堿化したポリサッカライド [ロカ (Rocha) ら、バイオケミカル ファーマコロジー (Biochemical Pharmacology) , 18: 1285 - 1295 (1969)] の抗炎症効果について報告した。

病理学的および生理学的活性を証明するポリサッカライドの文献報告は、よく尊重される科学雑誌のページへ殺到し続いている。それ故に、アロエ ベラの粘液質のゲルが本質的にポリサッカライドであり、これがアロエ ベラの医薬特性に秘密を持つことは非論理的ではない。ポリサッカライドがグルコマンナン、マンナン、ベクチンまたはいくつかの他の組成物であるかどうかについての不一致は、化学的精製段階の結果である。本発明によるアロエの製造により、部分的にアセチル化されたポリマンノースが病理学的活性を有する主要ポリサッカライドとして一貫して単離された。ヤギ (Yagi) らは、少し変形した抽出法を用いて、アロエ アルボレッセンス ミラー バー ナタレンシス (*Aloe arborescens Miller var. natalensis*) からアセチル化されたマンナン (アロエマンナン) を単離した [プランタ メディカ (Planta Medica) , 31: 17 - 20 (1977)]。しかし、オボドバ (Ovodova) は、同ヒアロエ種の主成分としてベクチンをより早くに単離した [キム ブライアーソエディン (Kimb. Prior. Soedin) , 83:

98888(1976)]。

発明の要約

本発明はアロエ植物中の活性化学物質をアロエの葉全体から物理的に抽出する方法に向けられている。この化学物質は実質的に非分解性であり、定められた量で投与されることができる。

本発明はまた、上記した方法により生成した形でのアロエ植物中の活性化学物質に向けられている。この活性化学物質は、実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥した線状ポリマーであることが見出された。マンノースモノマーは好ましくは β (1 - 4) 結合により互いに結合される。この活性化学物質は、分析化学的手法により、測定され、標準化され、そして特徴づけられた。

ここで使用されたような用語「活性化学物質」とは、アロエ ベラの儀の治療性および他の有益な特性の原因となる物質を意味する。ここで使用されたような用語「実質的に非分解性」とは、2年間に亘り分子量の減少が 5%未満である物質であって、かつ 2年間に亘りその生物活性を 95%より多く維持する物質を意味する。ここで使用されたような用語「実質的にアセチル化されたマンノースモノマー」とは、部分的にまたは実質的に完全にアセチル化されたマンノースモノマーを意味する。

本発明の方法は、アロエ植物の葉から、アロエ植物中の活性化学物質を抽出するための 1 つの方法であり、少なく

特表平2-503094(8)

- とも以下の工程を基本的に含む：
- (a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して、実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
 - (b) 前記洗浄した葉から、少なくとも第1の端部を除去すること；
 - (c) 前記の切断し洗浄した葉からアントラキノンに富む液汁を排液し、保存し、採集すること；
 - (d) 前記葉から外皮を除去して実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲル フィレットを製造すること；
 - (e) 前記実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲル フィレットを焼きそして均質化して、実質的にアントラキノンを含まない、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること；
 - (f) アロエジュースに、水溶性低級脂肪族極性溶媒を添加して活性化学物質を折出させ、それにより不均一溶液を形成させること；
 - (g) 不均一溶液から、水溶性低級脂肪族極性溶媒および可溶化物を除去して折出した活性化学物質を単離すること；および
 - (h) 折出した活性化学物質を乾燥すること。

この技術分野の当業者は、いかなる可能な手段でも、アロエの葉から可溶化物を有するアロエジュースを得ることができ、次いでこのジュースを工程(f), (g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができることを認識するであろう。

オンから効果的に分離される。

この技術分野の当業者は、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出するための別な方法が以下の工程を含むことを認識するであろう：

- a) アロエの葉を殺菌性溶液で洗浄して実質的にすべての表面の汚れとバクテリアを除去すること；
- b) 前記葉から外皮を除去して、アロエ ゲル フィレットを製造すること；
- c) 前記アロエ ゲル フィレットを挽きそして均質化して、可溶化物を有するアロエジュースを製造すること；
- d) アロエジュースに、水溶性低級脂肪族極性溶媒を添加して活性化学物質を折出させ、それにより不均一溶液を形成させること；
- e) 不均一溶液から、水溶性低級脂肪族溶媒および可溶化物を除去して、折出した活性化学物質を単離すること；および
- f) 折出した活性化学物質を乾燥すること。

上記したように、アントラキノンおよびイオンが水溶性であり、液体溶媒相に残り、かつ折出しないので、活性化学物質はこの方法により、アントラキノンおよび有害なイオンから効果的に分離される。

ここで用いられているように「実質的にすべての表面の汚れとバクテリア」の除去とは(1)残存する汚れが葉の重量の0.1重量%未満となる程度まで汚れを除去すること、および(2)残存する表面のバクテリアが葉1g当り100個

確かにこの技術分野の当業者は、工程(b), (c)および(d)に替えて代わりに(b)洗浄したアロエの葉を碎きそして(a) 碎いた葉を透析して好ましくない画分、すなわちアントラキノン、無機物および酸、ならびに外皮を化学的に除去して実質的にアントラキノンを含まないゲルを生成し、次いで工程(e), (f), (g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができるということを認識するであろう。

この技術分野の当業者はまた、工程(b), (c), (d)および(e)に替えて代わりに洗浄したアロエの葉を碎きそして可溶化物を有するアントラキノンに富んだアロエジュースを押し出し、次いでアロエジュースを工程(f), (g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができるということを認識するであろう。活性化学物質は、アントラキノンおよびイオンが水溶性であり、液体溶媒相に残り、かつ折出しないので、この方法によりアントラキノンおよび有害なイオンから効果的に分離される。

この技術分野の当業者はまた、工程(b), (c), (d)および(e)に替えて代わりに洗浄したアロエの葉全部を挽き、繊維状物質を識別し、そして残りを均質化して可溶化物を有するアントラキノンに富んだアロエジュースを生成することができることを認識するであろう。次いでアロエジュースを工程(f), (g)および(h)に供して活性化学物質を抽出することができる。活性化学物質は、上記した理由のためにこの方法によりアントラキノンおよび有害なイ

未済となるように表面バクテリアを殺すことを中心としている。

さらに私の好ましいプロセスは、さらにアロエジュースもしくはアロエ ベラ 固分を浸透圧的に調節するためにあるいはアントラキノンの濃度をさらに5 ppm未満あるいはさらに100 重量ppb未満にさえ引下げるために限外濾過の工程を含むことができる。

これらの工程は加工業者が大きな葉あるいは1年未満の小さな葉さえを使用することを可能にする。というのは成熟した葉に見られるポリマーサイズがより小さい未成熟の葉から選別され処理され得るからである。

このプロセスの利点の1つは、強風や採集方法が適切でなかったことにより使用不可能と從来は考えられていた損傷した葉を処理することができること、および好ましくない汚染物を透析によって除去することができるることである。

この限外濾過(透析)工程は膜技術を含んでいる。この膜技術は切断されたアロエの葉の状態に依存して、異なったポアサイズを有するフィルターの選択を可能にし、次のいかなる組合せも達成することができる：

- (1) 必要な場合にはアロエ ベラ ゲルから水と塩を分離する小さなポアサイズのフィルター(好ましくは約100ダルトン)。
- (2) 必要な場合にはアロエ ベラ ゲルから酸を分離することができる大きなポアサイズのフィルター(好ましくは約500ダルトン)。

(3) 必要な場合にはアロエ ベラ ゲルから黄色い液汁成分を分離することができるさらに大きなボアサイズのフィルター（好ましくは約2000ダルトン）。

(4) およびゲルマトリクスポリマーを分類し、分子量によってこれらを分割することができるさらに大きなボアサイズのフィルター（好ましくは約10,000～100,000ダルトン）。

限外済過装置としてはロミコン 4・カラム（ロミコン社、100 カミングスパーク、ウォーバーン、MA 01801、モデル No.HF4 SSS、メンブランタイプPH 50、メンブランNo.H526, 5-43-pH50）（Romicom 4-column (Romicom Co., 100 Cushing's Park, Woburn, MA 01801, Model No. HF4 SSS, Membrane Type PH50, Membrane Nos. H526, 5-43-pH50)）が推奨される。

別の好ましい実施態様として、このプロセスの洗浄工程は前記フィレットを除くのに先立ってタンブラーーオッシャー中に実質的にアントラキノンを含まないアロエ ゲル フィレットを洗浄することを含むことができる。

アロエ ベラ ゲルから活性物質を抽出する上記した方法のすべての間に、少量の有機物質および無機物質が生成物といっしょに析出することが見出される。無根性の多い部分はシュウ酸カルシウムを含む。シュウ酸カルシウムのような無根性の存在は生成物のコンシステンシーのため、および健康上の理由で除去されるかまたは少なくとも最少限に抑えなくてはならない。アルコールの添加に先立って

この技術分野の当業者は、最適の沈没時間が周囲温度、圧力ならびに水溶性低級脂肪族活性溶媒の性質に依存するということを認識するであろう。

上記抽出プロセスにおいて、熱ば活性化学物質の加水分解や分解を助長しうるので、沈没した活性化学物質はオーブン乾燥するよりも凍結乾燥によって乾燥することが望ましい。

上記抽出プロセスのすべてにおいて、アロエジュース中に含まれる何らかの纖維状物質（セルロース）も水溶性低級脂肪族活性溶媒によって析出される（precipitated）が、これはこの溶媒の添加によって早期に析出し、活性化学物質より密度が低い。この纖維状物質は、活性化学物質が沈降せしめられた後、溶媒の表面に停まる。従って極めて容易にこれを取り除くことができる。この技術分野の当業者は、溶媒を添加する前に、代りにアロエジュースを通過して纖維状物質を除去することができることを認識するであろう。

さらに好ましくは、上記プロセスのすべてにおいてアロエの葉または植物全体は、洗浄工程を省略することができる段に十分に清浄な畑から採集されうる。

乾燥した析出活性成分は所望によりガンマ線またはマイクロ波を照射して前記活性化学物質を殺菌し保存することができる。

従って本発明は、アロエベラ製品の製造のための新規かつ改良された方法を提供すると信じる。

ゲルのpHを約3.0から約3.5に調整するために有効量の硫酸を添加することにより、生成物が実質的に低い濃度のシュウ酸塩および他の無根性鹽を有するという結果になることが、驚くべきことにここで見出された。したがって、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出するための上記の方法のすべてにおいて、ゲルのpHは、アルコールの添加に先立って約3.0から約3.5に調整されることが好ましい。

好ましくは、アロエ植物の葉からアロエ植物中の活性化学物質を抽出する上記すべてのプロセスにおいて、1容積のアロエジュースに対して4倍量の水溶性低級脂肪族活性溶媒を加えて活性化学物質を析出させることができ。好ましい水溶性低級脂肪族活性溶媒は、メタノール、エタノールおよびプロパンノールである。最も好ましい溶媒はエタノールである。この技術分野の当業者は、活性化学物質がそれから沈没する限り、好ましい溶媒の代わりにその他の水溶性低級脂肪族活性溶媒を使用することができるこを認識するであろう。

上記抽出プロセスにおいて、活性化学物質が水溶性低級脂肪族活性溶媒とアロエジュースの混合物から約4時間で沈没せしめられることが好ましい。この混合物を4時間で沈没せしめると最高収量の活性化学物質が得られること、4時間を超えると沈没した活性化学物質が分解を始めることがわかった。しかし24時間の沈没期間後にかなりの量の活性化学物質が回収されるということもわかった。

本発明はさらに、アロエ植物の葉の明瞭に特徴的な部分の望ましくない組合せまたは混合を防止するやり方でアロエ ベラ植物の葉を処理する改良された方法を提供するとさらに信じる。

本発明はさらに、仕上がった抽出物中の望ましくない成分の濃度を最少にする、アロエ ベラ植物の葉の種々の抽出物を製造するための改良された方法を提供するとさらに信じる。

本発明はまた、アロエ ベラ植物の葉の特定の部分又はセグメントを特徴づける成る成分の濃度を最大にし、かつその葉の他の部分又はセグメントを特徴づける成る成分を最少にし、もしくはなくすような、アロエ ベラ植物の葉の抽出物を製造するための新規かつ改良された方法を提供すると信じる。

本発明はまた、アロエ ベラ植物の葉の黄色い液汁の濃度が低い、アロエ ベラ植物の葉からの抽出物を製造するための新規かつ改良された方法を提供すると信じる。

本発明は最後に、アロエ ベラ ゲル中の活性化学物質を抽出する方法を提供すると考えられる。この化学物質は非毒性免疫刺激化合物としての有用性を持つ。この物質は以下で、カリシン (Carrisyn) (商標) またはアセマンナン (acemannan) と呼ぶこととする。上記のようにアセマンナンは、分析化学の手法により標準化されそして特徴づけられた実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの実質的に非分解性の凍結乾燥された線状ポリマーであること

がわかった。

図面の説明

第1図および第2図は、アロエ ベラの葉の切取った部分を示している。

第3図は、本発明の方法に使用される好ましい葉洗浄装置の概略図を示す。

第4図はアロエ ベラの葉を切断し浸漬するための好ましい装置の概略図を示す。

第5図はアロエの切断物を細断してフィレットにし、かつ粗砕する好ましい装置の概略図を示す。

第6図は微細に均質化しつつ強過するための好ましい装置の概略図を示す。

第7図は処理されたアロエ材料をさらに分離するための透析装置の好ましい使用を示す概略図を示す。

第8図は異なるpH条件下でカリシンの2つのサンプルについての赤外線スペクトルを示す。

第9図はカリシンの示差温度記録図を示す。

第10図はシウ酸カルシウムで汚染されたカリシンの示差温度記録図を示す。

第11図はカリシンの特性化の概略図を示す。

第12図はブルラン (pullulan) ポリサッカライド標準物のサイズ排除クロマトグラムを示す。

第13図はカリシンのサイズ排除クロマトグラムを示す。

第14図はプロテアーゼ処理されていないカリシンの赤外線スペクトルを示す。

特表平2-503094 (10)

第15図はプロテアーゼ処理したカリシンの赤外線スペクトルを示す。

第16図はカリシンの示差温度記録図を示す。

第17図はグルコース、ガラクトース、マンノースおよびイノシトールの標準混合物のHPLCクロマトグラムを示す。

第18図はカリシンのHPLCクロマトグラムを示す。

第19図はラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコースおよびイノシトールの、それらのグリシトールアセテートとしての、標準混合物のGLCクロマトグラムを示す。

第20図はカリシンのGLCクロマトグラムを示す。

第21図はアセマンナンの量に対するマンノース/イノシトール比の標準曲線を示す。

第22図はカリシンの部分的にメチル化した、かつ部分的にアセチル化したグリシトールの総イオンクロマトグラムを示す。

第23図はカリシンの部分的にアセチル化したグリシトールのマススペクトルを示す。

第24図は部分的にメチル化したマンニトールアセテートの概略図を示す。

第25図はマススペクトル分析下でメチル化したマンニトールアセテートのフラグメントイオンの概略図である。

好ましい実施態様の詳細な説明

黄色い液汁と内部ゲルマトリクスの細分部分 (sub-

portions) がこれらの細分部分に特徴的な特性をもっていること、従ってそれらからの抽出物が相互に潜在的に識別し得る用途をもっていることを発見し、これを認識した。これらの識別し得る部分、これらの特性のいくつかのもの、および潜在的な用途のまとめは次の通りである。

部 分	細 部 部 分	用 途
黄色い液汁	(1) 沈 漂 物	緩下剤、防ばい剤 (antifungal)、抗生物 薬剤(antibiological)、 殺虫剤および日焼け止め 剤
	(2) 上澄み液	粘膜保護作用、 日焼け止め剤
内 部 ゲ ル	(1) 粘 泡 マトリクス	保湿剤、低アレルギー剤 (hypoallergenic)、 潤滑剤
	(2) ゲ ル	渾濁保護剤、細胞刺激剤、 フィレット 保湿剤、創傷治癒
	(3) 間 質 鍼 棒	天然防腐剤、止血剤
	(4) マニト リクス	細胞生長刺激剤
外 部 皮		殺虫性昆虫忌避剤、 紙パルプ樹脂

上記の知観ならびに認識に基づき、かつその意図された用途に依存して最終抽出物中の好ましい成分の質および濃

度を最適化するために、本発明のプロセスはアロエ ベラ植物の葉を特定の識別し得る部分と上記の細分部分に先ず分離すること、ならびに上記に定義したような細分部分の特定成分を分離し、かつ単離することに向けられている。このようなプロセスの具体的な詳細ならびに特徴は、以下の詳細な説明からさらに容易に理解され、また認識されることになる。本発明はまた、上記プロセスによって単離される特定の成分に向けられている。

本発明のプロセスによって製造される生成物は好ましくは、成熟した、戸外で生育したアロエ ベラ植物の外部の低い部分の葉から得られる。2年ものの植物は通常成熟している。しかし4年~5年ものの植物のより広い葉は、留まれる抽出物を一般により大量に含んでおりまた取扱いもより容易である。テキサス州のリオグランデバレーに生育するアロエ パルバデンシス ミラーの4年~5年ものの葉は最も好ましい。これらの葉は、一般にそれぞれ約1.5~2.5ポンドの量がある。貯まる特徴の用途または型品に依存して、これらの葉は植物からそれを切り取った直後に処理することができ、あるいはこれらは処理される前に種々の時間適当な条件の下に貯蔵することができる。さらに、葉の種々の成分の濃度は、葉が受ける季節的変動および環境条件によって影響を受ける。これらはすべて、植物の抽出物が向かられるべき特定の意図された用途に従って考慮されなければならない。

葉は、好ましくは処理に先立って茎のいかなる部分も損

傷することなしに、植物の根元近くから切り取るか引き抜かれるべきである。好ましくはポケットナイフのような6インチ未溝の小さなナイフを用い、茎のすぐ上の根元で葉を切り取り、混んだ細胞のゲルの漏出または黄色い液汁によるゲルの汚染を防止するために茎から葉を剥ぎ取る。葉の何らかの損傷は、識別し得る部分の好ましくない混合をもたらし、従って葉の特徴的成分の好ましくない混合をもたらす。

植物から除去した後、葉は通常これを適切な洗剤の溶液〔例えばヨークケミカル社(テキサス州グラス)が販売しているOLYMPIC POOL CHLOR 65(商標)〕を用いて穢やかにこすってあるいはスプレーして洗浄することによりきれいにされる。時には、このクリーニングは柔らかいブラシを用いて行う。洗浄した後、葉を清浄な水の中で十分に浸いで、洗剤溶液の痕迹を除去する。

各々の葉の底の白いもしくは明るい色の部分とその先端部分は、小さな鋭いナイフを用いて注意深く切ることにより除去される。葉の両端を実質的に構成しているこれらの部分は、別途に処理してそこから黄色い液汁を得ることができ、この黄色い液汁は上記の黄色い液汁の特性をもった成分を有する製品を製造することが望ましい用途に向かう。

各々のアロエ・ペラの葉の残存部分は次に、横に切断して短い断片、好ましくは長さが0.5インチの断片にし、各断片を高強性、等強性もしくは低強性であることができる

水溶液(好ましくは脱イオン水)中に直立に置き、もって断片から黄色い液汁を排出する。あるいは、上記の特徴を有するその他の製剤に使用するために黄色い液汁を採取することが望ましい用途においてはこれらの断片を、好ましくはステンレススチール製のワイヤメッシュの底をもったステンレススチール製の、乾燥採集容器中に直立に置き、放置排液させ、そして水と接触させるために水でもって葉を透析させることができる。

このようにして断片は、約20~30分間排液することを許される。切断した断片は最終的にシールを形成し排液を停止する。落められた黄色い液汁は次に適当な時間放置すると、2つの細分部分すなわち沈澱物と上澄みにそれぞれ分離する。黄色い液汁は無傷の皮膚(損傷されていない皮膚)に対する良好な日焼け止めをつくるのに有用であり、オリーブ色の日焼けした色をもった皮膚を与える、かつまた親下剤の製造に有用である。

切断した葉の断片から黄色い液汁を除去する操作が完了した後、この断片を次にワイヤー(すなわち家庭用チーズ)スライサーまたは剥皮ブレード(例えば剥皮ナイフ)のような任意の適当な道具を用いてフィレット(fillet)を形成するように皮を剥いで、外皮すなわち葉の断片の皮およびこの外皮のすぐ下にある層を除去する。葉の断片を凍結してこの剥皮操作を容易にすることができる。剥皮した後、残存しているものは内部ゲルマトリクス部分(フィレット)であり、この部分を検査し、付着している皮もしくは変色

した部分を除いて残存している黄色い液汁をそこから取り去るべく指できれいにする。この黄色い液汁の残りの除去を容易にするために、穢やかな水のスプレー好ましくは脱イオン水(かつアルコールを含まない)のスプレーを用い、あるいはゲルマトリクス部分をきれいな流水に沈める。

得られたフィレット(内部ゲルマトリクス)を次に約1時間排液することができる。この排液操作の間に、通常粘液質の被膜がこのゲルマトリクスの表面に生成する。この被膜は、重力によってあるいは遠心分離のような適当な手段によって補助されて採集される。この求められた被膜は上記粘液細分部分である。

ゲルマトリクスストリップの形をしたゲルマトリクスの残りを次に握りつぶし、細断し、あるいはブレンドしてその内部に存在する間質繊維を破壊し、あるいはゲルマトリクスストリップを液化のためにワイヤメッシュまたはフィルタースクリーンを強制的に通過させることができる。この得られた物質を次に統一して均質化することができる。あるいはこのゲルマトリクスストリップを凍結し、解凍し、次に混合して繊維を有する液状物質を製造する(この物質は上記ゲルマトリクスの細分部分を構成する)。次にこの物質を過濾して、間質繊維細分部分を得ると共に、上記残存マトリクス細分部分を残す。

このようにして得られた均質化された抽出物は、典型的には約4~5のpH、好ましくは約4のpHをもっている。

記載されたプロセスにおけるすべての工程はほぼ室温で

行なわれる。

第3図~第7図はこのプロセスの好ましい実施想模をさらに詳細に開示している。具体的には第3図には、葉の洗浄装置が開示されている。アロエ・ペラの葉の洗浄装置(トンプソン・マニュファクチャリング社、ハーリントン、テキサス州(Thompson Manufacturing Company, Harlington, Texas))Aが使用され、それによって葉は最初にバット4で前投漬される。葉全体5は次に手でコンベアベルト6に置かれ、それによって葉は2つのブラシ9aと9bの下に引張られる。コンベアベルト6はモーターとハウジング5から伸びているブーリー6により第2の端部で回転する傾斜7を経て駆動されており、これもトンプソン・マニュファクチャリング社から提供されたものである。葉は、第2のブラシ9bを通って進むことでブラシをかけられかつ洗浄されるので、葉はコンベアベルト6の端部10で検査され、それによって葉は視覚的に検分され、十分にきれいかどうか決められる。十分にきれいでない場合には、さらなる洗浄のためにバット12に入れられ;十分にきれいなら、階段18を有する上部へ移動するコンベア14上に置かれ、それによって個々の葉はそれぞれ噴霧器11により水道水でさらによく洗浄されることができる。コンベア14はテキサス州シーゴビルのグラス・ミル・ライト社(Dallas Hill Wright Co. of Seagoville, Texas)により提供された。すすぎ噴霧器11はテキサス州シーゴビルのケイ・プランピング(Key Plumbing Seagoville, Texas)により提供された。

ステンレスチールバット¹²は316ステンレススチール製であり、テキサス州グラスのナショナルシートメタル社(National Sheet Metal Company of Dallas, Texas)による特別注文品である。

洗浄後、第4図に示したように葉は切断され浸漬される。コンペア¹¹の階段¹³を通って上へ移動した後、きれいな原料葉¹⁵はくずの除去のため穴¹⁵を備えたトレイ¹⁴に落ちる。トレイ¹⁴は、テキサス州グラスのナショナルシートメタル社(National Sheet Metal Company of Dallas, Texas)により提供された316ステンレススチール製の切断および浸漬装置¹¹の部分である。この装置は特別注文製である。トレイ¹⁴の上で葉は、穴¹⁵を通してごみ容器(示していない)へ処分される先端と尾端を有する両端のところで手で切断される。切断した葉¹⁵は次に、ステンレススチール製のワイヤーメッシュの底を各々有するステンレススチールの多数のバスケット¹⁶のいずれか1つの中に積まれる。次にこれらのバスケット¹⁶はステンレススチール製のトラックの中に置かれる。このトラックは台形のロート¹⁷の上部を形成し、もとのロート¹⁷によって黄色い液汁がバスケットを通して葉の底部から排液され、ロート¹⁷の底部に落する。黄色い液汁は定期的に取り出され、貯蔵のために凝結される。黄色い液汁の排液の工程は約30分間かかる。

この工程の後、バスケット¹⁶の中にまだ残っている切断された葉¹⁵は、白羽のロート¹⁷に最も近接した位置で水浴

¹⁸に手で移される。向流の流れの中で水が台形ロート¹⁷から最も離れた点において入口水パイプ¹⁹から浴¹⁸の中に入り、次に台形ロート¹⁷に最も近接した点で出口水パイプ²⁰を通って排出される。トレーは台形ロート¹⁷から遠ざかる方向に水浴中を手動で徐々に動かされ、バスケットが水浴¹⁸内に停まっている洗浄工程はおよそ1時間かかる。

洗浄後、バスケットは乾燥のためにトレー²¹の上に置かれ、これは僅か数分間維持する。ワイヤーメッシュ、黄褐色の液汁の排出および自動洗浄装置を含めて、バスケットに関する第4図のアッセンブリ全体はやはり、テキサス州グラスのナショナルシートメタル社によって特注製作された316ステンレススチール製である。

洗浄後、トレイ²¹の上のバスケット¹⁶の中の積まれた切断された葉¹⁵は次いで、第5図に示すようにさらに切断してフィレットにするための領域に移動される。実質的に透明な材料だけが残るように、外皮²²がフィレットから取り除かれる。外皮²²の残部は捨てられる。次フィレット²³は粗粉碎機²⁴に原料供給するトラフ²³の中に置かれる。このトラフ²³はテキサス州グラスのナショナルシートメタル社によってつくられた316ステンレススチール製である。この粉碎機はモデルNo.5150-N-SINK-ILERATOR(テキサス州グラスのワトソンフードサービスインダストリーズ社)(Watson Food Service Industries, Inc., Dallas, Texas)である。粉碎機²⁴によって粗粉碎した後、この粉碎機から出てくる処理された材料²⁵は、316ス

テンレススチール製の垂直單殻タンクを有するおよそ100ガロンの容量をもつ可搬タンク^E(テキサス州グラスのバントーン社を通して販売されているベルマ・サン製)(Perma-San, Manufacturer, distributed through Van Tone, Inc., Dallas, Texas)を通る。粗粉碎フィレット²³はベルマ・サン搅拌機(モデルNo.A A P H 2)(これもテキサス州グラスのバントーン社から販売されている)によってタンク^E内で搅拌される。

粗均質化の後、タシク²⁶からの物質は微細均一化および(任意的な)通過のための別途の領域に送られる。第6図においてタンク^Eからの材料は、オハイオ州クリーブランドのリライアンスエレクトリック社のリライアンスマーターモデルNo.B78Q2180M-VF(Reliance Motor Model No.B78Q2180M-VF of the Reliance Electric Company, Cleveland, Ohio)によって駆動されるポンプ²⁸(テキサス州グラスのクレパコ社(Crepaco, Inc., Dallas, Texas)によって販売されているステンレススチール製の追心ポンプモデルNo.4V-81)によって微細中モゲナイザー^F(テキサス州グラスのクレパコ社モデルNo.3D D 13)にポンプ輸送される。微細均質化の後、この材料は810ステンレススチール製の大さな1000ガロン垂直單殻混合タンク^G(テキサス州グラスのバントーン社に販売されているベルマ・サン製)に送られる。微細に粉碎されたフィレット²³はベルマ・サン搅拌機^{26a}(テキサス州グラスのバントーン社から販売されているベルマ・サン製)のモデル

No. A A P H 2)によって搅拌される。タンク^G中の材料^Aは、これを取り出して、排気ライン²⁸を通るバルブの除去のためのフィルター^{27b}を備えた1ユニットを形成するポンプ^{27a}に送られることができる。ポンプ^{27a}とフィルター^{27b}はロマート珪藻土フィルター(テキサス州グラスのアレン・リクリエーション社(Allen Recreation Company)によって販売されているモデルNo.99-2138)の一部を形成している。沪過された材料は次にタンク^Hにポンプ³⁰輸送される。このタンク^Hはタンク^Gと同じようにふた²⁹を備えることができる。

第7図において微粉碎されたフィレット^Aは、部分的に沪過され、ミキサー²⁹によって搅拌され、ポンプ³⁰によって造粉器にポンプ³⁰輸送される。ミキサー²⁹は、ベルマ・サン搅拌機(テキサス州グラスのバントーン社販売のモデルNo.A A P H 2)である。ポンプ³⁰は、スペリアステンレススチール製モデルSCS 45プロセスポンプ(ウィスコンシン州デラパンのスペリアステンレス社製)である。プロセスポンプ³⁰には4,450rpmのバンドモーター製の3馬力のモーター^{30a}(アーカンソー州, Ft. Smith Arkansas)が取り付けられている。ポンプ³⁰によってポンプ³⁰輸送された材料は、4個のフィルター³¹(図示されていない)を有する造粉ユニット^J(マサチューセッツ州ウォバーン、ロミコン社製のロミコンモデルHF 4 SSS限外沪過システ

ム) (Romic Model HF4SS ultrafiltration system made by Romic Inc., Woburn, Massachusetts) を通過する。各フィルターはフィルターハウジング32中に収容されている。材料は一部が分離ライン34を通りて分離排出ライン35に取り出され得るような地点まで垂直に通過する。その他の分離されなかった材料は、再循環返送ライン33から透析装置に戻されるか、あるいは分離返送ライン36を通ってバット1に戻され再循環される。

現まっているアロエの画分および求められている最終型品に依存して、所望の材料が加工の後に分離排出ライン35を通して、あるいはバット1の中で得られる。例えば過剰の水とミネラルが除去される必要がある場合には、小さなボアサイズの限外フィルターを用いて水とミネラルを分離し、ライン35を通して排出し、所望のアロエ画分をバット1に返送することができる。このプロセスは、所望の量の塩と水がバット1中に含まれる生成物から取り除かれるまで、この生成物を透析ユニットを通して単に循環することによって繰り返されることができる。このプロセスは2つ以上の透析工程を含むことができる。例えば先に説明したように、塩、低分子量の糖および非所望のアントラキノン類は第1透析工程で取り除くことができる。非所望の材料は分離排出ライン35から排出され、望ましい画分はバット1に戻される。この工程はロミコンから得られる10,000ダルトンのボアを有する限外フィルターを用いることによって行われる。次に10,000ダルトンの限外フィルターと同じ

くロミコン社から得られる50,000ダルトンの限外フィルターで置き換え、透析プロセスを繰り返す。この透析プロセスはここでゲルマトリクスピリマーを2つの画分に分離する。第1画分は10,000~50,000ダルトンのサイズのゲルマトリクスピリマーからなり、分離排出ライン35から排出され、第2画分はサイズが50,000ダルトンより大きいゲルマトリクスピリマーからなり、バット1に戻される。このプロセスは、与えられた生成物から取り出すことが必要とされる塩および水の量に依存して数分間ないし数時間にわたって繰り返すことができる。

第7図において分離返送ライン36は、テキサス州ダラスのテキサス ラバー サプライ社 (Texas Rubber Supply Company, Dallas, Texas) によって供給されるタイゴン (Tygon) チューブ (食品グレード) 型である。分離排出ライン35は、テキサス州ダラスのバントーン社販売の316ステンレススチール製パイプである。

残りのマトリクス細分部分は次いで処理されて、アロエベラ ゲル中の活性化学物質であるアセマンナンを分離し、半離し、そして精製することができる。残りのマトリクス細分部分からアセマンナンを分離するために、過剰の水溶性低級脂肪族活性溶媒を残りのマトリクス細分部分に添加する。するとアセマンナンはこの混合物から沈殿し始める。この溶液は、できるだけ多くの活性成分を溶液から沈殿させるのに十分であるが、アセマンナンが分解しはじめると長くてはいけない時間、放置される。この時間の後、該

静した沈殿物を乱すことなく上澄をデカントするかまたは吸い上げて除去する。次に沈殿物および残っている溶液を適当な遠心分離装置に入れ、沈殿物を洗めてペレットにする。遠心分離後、上澄をデカントし、捨てる。所望ならば、このペレットを水溶性低級脂肪族活性溶媒の新鮮なもので洗浄し、再び集め、上澄を再度捨てる。このペレットは次に凍結乾燥し、そして1晩乾燥を許す。得られた生成物はアセマンナンの実質的に非分解性の凍結乾燥形である。得られた生成物はすりつぶして粉末にすることができる。好ましくは、低級脂肪族活性溶媒の添加に先立って、適当な酸をアロエ ベラ ゲルに添加する。除去を容易にするために、酸を加えてアロエ ベラ ゲル中に含まれるシウ酸カルシウムを可溶化する。好ましくはシウ酸カルシウム不純物を可溶化するために十分であるが、アセマンナンポリマー鎖を分解しない濃度で酸を加える。

アセマンナンを分離し、かつ単離するために代わりうるそして好ましい方法は以下の工程を含む。

成熟した戸外で生育したアロエ ベラ植物からの葉を植物の根元に近いところから、引き抜くか切り取る。これは好ましくは処理に先立って葉のいかなる部分も損傷することなしに行なう。透明な細胞のゲルの漏出または黄色い液汁でのゲルの汚染を防止するために、葉は好ましくは茎のすぐ上の植物の根元で切り取り、茎から剥ぎ取る。

植物から除去した後、葉の尾端および先端部分を除去し、切り取った葉は分離プロセスにおいて上記したように、皮

を剥いでフィレットを形成させる。

得られたフィレット (内部ゲルマトリクス) を次に、すりつぶし、細断またはブレンドしてその内部に存在する間質繊維を破壊し、または内部ゲルマトリクスを液化のためにワイヤーメッシュもしくはフィルタースクリーンを強烈に通過させることができる。この得られた液化内部ゲルマトリクスを次に均質化する。かくして得られる均質化された抽出物は典型的には約4から約5、好ましくは約4の川を有する。均質化された抽出物は次に沪過して間質繊維を除く。均質化され沪過された抽出物は次いで、すぐ前で述べた残りのマトリクス細分部分と同一の手法で処理してアセマンナンを分離し、そして単離することができる。

アセマンナンを分離しかつ単離するために別の代わりうるそして好ましい方法は以下の工程を含む。

成熟した戸外で生育したアロエ ベラ植物を植物の根元に近いところから引き抜くか切り取る。これは好ましくは処理に先立って葉のいかなる部分も損傷することなしに行なう。透明な細胞のゲルの漏出または黄色い液汁でのゲルの汚染を防止するために、葉は好ましくは茎のすぐ上の植物の根元で切り取り、茎から剥ぎ取る。

葉は次に適当な手段、例えばテキサス州ハーリングデンのトンプソン マニュファクチャリング社によって作られた「トンプソン アロエ押出機」 ("Thompson Aloë Extruder" made by Thompson Manufacturing Company, Harlingen, Texas) によって押しつぶされて、アロエ

特表平2-503094(14)

ジュースを押し出すことができる。この押し出されたアロエジュースは次に、前に述べた残りのマトリクス細分部分と同一の手法で処理してアセマンナンを分解し、かつ単離することができる。

記載した方法のすべての工程は、好みしくは約-50°Cで行なう凍結乾燥工程を除いて、ほぼ室温で行なわれる。

本発明の開示されたプロセスおよび組成物の種々の改変ならびに代替的改良、変形ならびに均等物は上記一般的な説明を読めばこの技術分野の当業者に明らかになるであろう。以下の実施例は単に例示的なものであって、このような改変、均等物もしくは変形をカバーする添付されたクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

実施例 1

アセマンナンを分解及び単離するための工程

A. 予備的作業：

1. 予め清掃したタンク、ミキサーおよび付属器具類を50%イソプロピルアルコール(I.P.A.)溶液で消毒し、熱い脱イオン水で溶いでI.P.A.を除去した。

2. ポンプ及び付属のホースを5% "H.T.H." 塩素水泳プール溶液を通して洗い、次いで水を勢いよく流して洗った。

3. このポンプと付属のホースを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。ポンプと付属のホースを熱い脱イオン水を用いてイソプロピルアルコールがなくなるまで勢いよく流して洗った。

の葉をロート状のステンレススチール製コレクターの頂部に一緒に配置した複数のステンレススチール製バスケット型コンテナの中に入れた。それぞれのコンテナはメッシュの底をもっている。黄色い液汁は、約30分間葉から排出することを許された。黄色い液汁はステンレススチールバスケットのメッシュ底を通過し、ロート状コレクターに集められた。

アロエの葉を入れているステンレススチール製バスケット型コンテナをコレクタから取り外し、次に第2のステンレススチール製容器に沈めた。この第2のステンレススチール製容器は上記のコンテナに対して向流に動く逆流的に水平に流れる混ぎ水の室温の水浴を含んでおり、前記コンテナは約30分間~1時間で前記容器の一端から多端まで手でゆっくり動かされる。このことは、黄色い液汁がさらに葉から排出することを許す。この葉は、この浴液に80分間浸漬されることを許した。

次に葉をこの浴液から取り出し、脱いナイフまたはワイヤーチーズスライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を除去して、それぞれの葉の部分からアロエ ゲル フィレットをつくる。このアロエ ゲル フィレットは目で検査され、特徴的な黄色い変色によって検出される何らかの汚染されたアロエ ゲル フィレットもしくはフィレット部分は捨てられた。汚染されていないアロエ ゲル フィレットの全体の量は、葉の大きさ及び条件に依存して、初めの葉の重量の20~80%であった。

4. ホモグナイザーと付属ホース及びポンプを50%イソプロピルアルコール溶液で消毒した。このホモグナイザーと付属のホースを熱い脱イオン水を用いてイソプロピルアルコールがなくなるまで勢いよく流して洗った。

リオグランデバレーから採集したアロエ バルバデンシス ミラーの葉を収穫した後、8時間以内に40~45°Fの冷蔵トランクに移し、処理するまで40~45°Fで冷蔵して分解を少なくした。

次に貯蔵した葉20~60ポンドを室温の次亜塩素酸カルシウムの水溶液の予備洗浴中に入れ、実質的に葉から表面の汚れを除去しつつ葉に付いた表面のバクテリアを殺した。次亜塩素酸カルシウムの水溶液は、1Lの水に90%次亜塩素酸カルシウムを約0.125g加えて逆起塩素50ppmを含む溶液をつくることにより調製した。葉は、予備洗浴中に約5分間滞留させた。

次に、実質的に汚れとバクテリアを含まない葉をテキサス州ハーリングデンのトンプソン マニュファクチャリング社(Thompson Manufacturing Company, Harlingen, Texas)製のトンプソンアロエウォッシャーの水平コンベアベルトの上に乗せた。このトンプソンアロエウォッシャーは、室温の水で葉を洗浄して葉から表面の汚れ及び次亜塩素酸カルシウムの水溶液を除去した。再びこの葉を視覚的に検査し、必要により手でこすって葉の表面に残存する表面の汚れを除去した。この葉を次に室温の水で温いだ。

次に先端部分及び基部をそれぞれの葉から取り除き、こ

次に汚染されていないアロエ ゲル フィレットを、750座席のレストラン用のステンレススチール製屑処理ユニットに入れた。このユニットはフィレットを濃厚であるがしかし自由に流动する(粗均質化)液体のコンシステンシーをもつ平均粒子サイズまで粗碎した。このステンレススチール製の屑処理ユニットはN・シンク・イレイク・ディビジョン オブ エマーソン エレクトリック社(N-Sink-Erator Division of Emerson Electric Co., Racine, WI)製のモデルNo S S - 150 - 13. シリアルNo 115132であった。

次にこの粗碎アロエ ゲル フィレットを100ガロンのステンレススチール製保持パットに移した。この保持パットはプロセスイクリップメント社(Process Equipment Corp., Balding, Illinois)製のモデルNo 100 ガロンO.V.C.、シリアルNo 40885-3であった。

この保持パットから粗碎アロエ ゲル フィレット溶液をホモグナイザーにポンプで輸送した。ホモグナイザーはクレバコ フード イクリップメント アンド リフリゲレーション社(Crepac Food Equipment and Refrigeration Inc., of Chicago Illinois)製のシリアルNo 04-03であった。このホモグナイザーは、ミルクの均質化のために畜産アロセスにおいて一般的に使用されているタイプのものであった。粗碎アロエ ゲル フィレット溶液は、約1,500psiの圧力で微細に均質化された。

ホモグナイザーから微細に均質化されたアロエ ゲル

特表平2-503094 (15)

フィレット溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ転送した。この貯蔵タンクは、プロセス イクリップメント社 (ミシガン州ベルディング) (Process Equipment Corp. of Belding, Michigan) 製のモデル No 1000ガロン OVC, シリアル No 40866-2であった。均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液の全重量は、出発の薬の重量の 20~80% であった。次に必要により、均質化した生成物を限外汎過を用いて過剰した。

次に、微細に均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液を、レスリー社 (Leslie) 製ダイアトマセアス アースフィルター (Diatomaceous Earth Filter) モデル DE - 48 を用いて済過して、開質の纖維を除いた。けいそう土の代わりに該開質纖維自体が済過媒体として用いられ、その雄雄は、ナイロンメッシュ布のフィルター支持体によって支持される。十分な量の纖維が済過媒体として役立つほどに蓄積することが出来るように、出口を開ける前数分間、ゲルをポンプでフィルターに通した。

次に、済過したアロエ ゲル フィレット溶液20ガロンを、100ガロンのタンクにポンプで転送し、190ブルーフ (proof) の未変成エタノール (エチル アルコール, 190ブルーフ、米国販局方 (U. S. P.)、販格名、U. S. インダストリアル ケミカルズ社 (U. S. Industrial Chemicals, Co., イリノイ州 61953, タスコラ、私書箱 218) を通じて入手される、54ガロンのバッチ アイ ディー (Batch I. D.) # C T 185 J O 4) 80ガロンを、アロエ ゲル フィ

レット溶液に加えた。その溶液を、プロセス イクリップメント社 (Process Equipment Corp., ミシガン州ベルディング) 製ペルマ・サン (Perma-San) プロペラ攪拌機 (モデル # AAPGF - 4A) を用い、20~30分間攪拌した。

次にそのアルコール - ゲル溶液を、直ちに、いくつかの直径10.5インチ、高さ8インチ、18 - 8ステンレススチール製の11フォートのパン (ブルームフィールド インダストリーズ社 (Bloomfield Industries Inc., イリノイ州シカゴ) 製、ワトソン フード サービス イクリップメント アンド サプライズ社 (Watson Food Service Equipment and Supplies, テキサス州グラス、ハーガウェイ 3712) より入手される) に移した。

アルコール - ゲル溶液を、次に約4時間沈降させた。

次に、透明液状上澄みを、パンの底に沈殿した沈澱物をかき乱さぬよう注意しながら、デカントし、または吸引上げた。次に、沈澱物及び残った溶液を、4つの、1パイントのステンレス鋼製遠心分離バケツ (buckets) に、それぞれのバケツに沈澱物及び残った溶液が約500g 移されるように移した。次にバケツを2000×g で約10分間、アイイーシー セントラ - 7 遠心分離機 (IEC Centra-7 Centrifuge, インターナショナル イクリップメント社 (International Equipment Co., マサチューセッツ州 02194, ニーダムハイツ, 2番街300) 製、アメリカン サイエンティフィック プロダクツ社 (American Scientific

Products, テキサス州 75050, グランドブレーリー、私書箱 1048) より入手される) を用いて回転させた。

遠心分離の後、上澄み液をデカントし、捨てた。次にそのペレットを新鮮な190ブルーフの未変性エタノールで洗い、再び2000×g で約10分間収集した。再度の回転の後、上澄み液を捨てた。

次に、そのペレットをいくつかの600 mlのバーチス (VIRTIS) 凍結乾燥ジャーに移し、液体窒素中で凍結するまで回転させた。この凍結乾燥ジャーを次に、ウェルチ デュオ - シール (Welch Duo-seal) 真空ポンプ (モデル No 1402, サージェント - ウェルチ (Sargent-Welch, テキサス州 75235, グラス、私書箱 35445) より入手される)、バーチス液浸コイル冷却器 (Virtis Immersion coil cooler, モデル No 6205-4350, クーラー、アセトン浴中) 及びバーチス18ポート真空ドラム マニホールド (Virtis 18 Port Vacuum Drum Manifold, モデル No 8211-0350) から成る凍結乾燥装置に取り付けた。バーチス社の装置は全て、アメリカン サイエンティフィック プロダクツ社 (American Scientific Products, テキサス州 75050, グランドブレーリー、私書箱 1048) より入手される。凍結乾燥ドラムは、-50°C に保持したアセトンで潤された。

そのサンプルを終夜、乾燥するまで凍結乾燥し、次にメトラー エーイー (Mettler AE) 163の天びんで計量した。残ったサンプルは、本質的に交換しない、凍結乾燥されたカリシン (登録商標) から成る。アロエ ベラ ゲル 20ガ

ロンからの収量は、カリシン約145~155g であった。

実施例 2

アセマンナンを分離及び単離するための工程

リオグランデバーーから採集したアロエ バルバデンシス ミラーの葉を収穫した後、8時間以内に40~45° F の冷蔵トラックに移し、処理するまで40~45° F で冷蔵して分解を少なくした。

先端部分及び基部をそれぞれの葉から取り除いた。次に脱いナイフまたはワイチーズライサーを用いてそれぞれの葉から外皮を除去して、それぞれの葉の部分からアロエ ゲル フィレットを作った。

次にアロエ ゲル フィレットを、750座席のレストラン用のステンレススチール製の屑処理ユニットに入れた。このユニットはフィレットを過厚であるがしかし自由に流動する (粗均質化) 液体のコンシスティンシーをもつ平均粒子サイズまで粗粒化した。このステンレススチール製の屑処理ユニットは、N - シンク - イレイタ - デビジョン オブ エマーソン エレクトリック社 (N-sink-erator Division of Emerson Electric Co., Racine, WI) 製のモデル No SS-160-18, シリアル No 116182 であった。

次にこの粗粒アロエ ゲル フィレットを 100ガロンのステンレススチール製保持バットに移した。この保持バットはプロセス イクリップメント社 (Process Equipment Corp., Belding, Michigan) 製のモデル No 100 ガロン OVC, シリアル No 40866-5 であった。

この保持バットから粗砕アロエ ゲル フィレット溶液をホモグナイザーにポンプで輸送した。ホモグナイザーはクレパコ フード イクリッピメント アンド リフリジレーション社(イリノイ州シカゴ) (Crepaco Food Equipment and Refrigeration Inc., of Chicago, Illinois) 製のシリアルNo.04-03であった。このホモグナイザーは、ミルクの均質化のために超長プロセスにおいて一般的に使用されているものであった。粗砕アロエ ゲル フィレット溶液は、約1,500psiの圧力で微細に均質化された。

ホモグナイザーから微細に均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液をステンレススチール製貯蔵タンクにポンプ輸送した。この貯蔵タンクは、プロセス イクリッピメント社(ミシガン州ベルディング) (Process Equipment Corp., of Belding, Michigan) 製のモデルNo.1000ガロン OVC, シリアルNo.40886-2であった。均質化されたアロエ ゲル フィレット溶液の全重量は、出発の藻の重量の20~80%であった。次に必要により、均質化した生成物を限外汎過を用いて過剝した。

次に、均質化されたゲルを、レスリー社(Leslie)製ダイアトマセラス アース フィルター (Diatomaceous Earth Filter) モデルDE-40を用いて汎過し、簡便な繊維を除いた。けいそう土の代わりに試験質繊維自体が汎過媒体として用いられ、その繊維は、ナイロンメッシュ布のフィルター支持体によって支持される。次に、十分量の繊維が汎過媒体として投立つほどに蓄積することが出来るように、

出口を開ける前数分間ゲルをポンプでフィルターに通した。

次に、過剝したゲル20ガロンを、100ガロンのタンクにポンプで輸送し、100ブルーフの未変性エタノール [エチル アルコール, 100ブルーフ, 米国薬局方 (U. S. P), 品格な、U. S. Industrial Chemicals, Co., イリノイ州61953, タスコラ, 秘書箱218] を通じて入手される、64ガロン バッチアイディー (Batchl.D.) # C T 185T 04] 80ガロンを、アロエ ゲル フィレット溶液に加えた。その溶液を、プロセス イクリッピメント社(Process Equipment Corp., ミシガン州ベルディング) 製ペルマ・サン (Perma-San) プロペラ攪拌機 (モデル# AAPGP-4A) を用い、20~30分間攪拌した。

そのアルコール・ゲル溶液を、次に、直ちにいくつかの、直径10.5インチ、高さ8インチ、18-8ステンレススチール製の11クオートのパン [ブルームフィールド インダストリーズ社 (Bloomfield Industries Inc., イリノイ州シカゴ) 製、ワトソン フード サービス イクリッピメント アンド サプライズ社 (Watson Food Service Equipment and Supplies, テキサス州グラス, ハーガーウェイ8712) より入手される] に移した。

アルコール・ゲル溶液を、次に、約4時間沈降させた。

次に、透明液状上澄みを、パンの底に沈殿した沈殿物をかき乱さぬよう注意しながら、デカントし、または吸引上げた。次に、沈殿物及び残った溶液を、4つの、1パイイン

トのステンレススチール製造心分離バケツ (buckets) に、それぞれのバケツに沈殿物及び残った溶液が約500g 積されるように、移した。次にバケツを2000×gで約10分間、アイイーシー セントラ・7 速心分離機 (IEC Centra-7 Centrifuge, International Equipment Co., マサチューセッツ州02104, ニーダムハイツ, 2番街800) 製、アメリカン サイエンティフィック プロダクツ社 (American Scientific Products, テキサス州75050, グランドブレーリー, 秘書箱1048) より入手される)) を用いて回転させた。

速心分離の後、上澄み液をデカントし、捨てた。次にそのペレットを新鮮な100ブルーフの未変性エタノールで洗い、再び2000×gで約10分間回転した。再度の回転の後、上澄み液を捨てた。

次に、そのペレットをいくつかの 600ml のバーチス (VIRTIS) 凍結乾燥ジャーに移し、液体窒素中で凍結するまで回転させた。この凍結乾燥ジャーを次に、ウェルチ デュオ・シール (Welch Duo-seal) 真空ポンプ [モデルNo.1402, サージェント・ウェルチ (Sargent-Welch, テキサス州75285, グラス, 秘書箱85446) より入手される] 、バーチス液浸コイル冷却器 (Virtis Immersion Coil Cooler, モデルNo.8206-4860 クーラー, アセトン浴中) 及びバーチス18ポート真空ドラムマニホールド (Virtis 18 Port Vacuum Drum Manifold, モデルNo.5211-0350) から成る凍結乾燥装置に取り付けた。バーチス社の装置は

全て、アメリカン サイエンティフィック プロダクツ社 (American Scientific Products, テキサス州75050, グランドブレーリー, 秘書箱1048) より入手される。凍結乾燥ドラムは、-60°Cに保持したアセトンで満たされた。

そのサンブルを終夜、乾燥するまで凍結乾燥させ、次にメトラー エーイー (Metler AE) 189の天びんで計量した。残ったサンブルは、本質的に変質しない、凍結乾燥されたカリシン (登録商標) から成る。アロエ ベラ ゲル20ガロンからの収量は、カリシン約145~185g であった。

実施例 3

カリシスを分離及び単離するための標準的な実験室規模のプロセス

約50ポンドのアロエ バルバデンシス ミラーの葉を水で洗いそしてこすって、汚れた乾燥したラテックスとその他の汚染物を除去した。次にそれぞれの葉の外皮を除去し、フィレット全体を大きなビーカー (氷上) に入れた。

1.5リットルバッチでアロエ フィレット全体をワーリング ブレンダー (Waring blender) にかけた。フィレットを室温で2分間高速で2回ブレンドした。このブレンドしたフィレットを次に4℃で冷却してブレンド操作中に発生した泡を消失させた。

次にこのブレンドしたアロエジュースを4層のコットン (クリーブランド コットン) に通して過剝して纖維質のセルロース系バルブを除去した。次に過剝液を6層のコットンに通過させ、約4リットルのアロエジュースを集めた。

特表平2-503094(17)

次にこのアロエジュースを大きなガロンのステンレススチール製コンテナに入れた。この達成したジュースに、10リットルの冷却したエタノール（フィッシャー-エタノール試薬級 Cat. No. A995）を加えた。このエタノールは、アロエジュースを搅拌しながらゆっくり加えた。錐状の析出物が形成された。混合物を15~30分間搅拌し、室温で約2時間静置した。

次に上澄み液をデカントして除き、ペレットを小さなブレンダーに入れ、このブレンダーに1リットルの脱イオン水を加えた。この混合物を低速で数分間ブレンドしてペレットを洗净し、次いで8リットルのナルゲン（nalgene）コンテナに入れた。この混合物にさらに4リットルのエタノールを加え、混合物を80分間搅拌した。生成した析出物を約2時間沈降させた。

上澄み液の大部分をデカントして除き、得られたペレットを室温で20分間 $2000 \times g$ で遠心分離して、残りの溶媒をデカントし易くするために析出物をペレット化した。

次にこのペレットを凍結乾燥フラスコに入れ、バーチス凍結乾燥機中で1晚凍結乾燥した。

凍結乾燥された粉末の重量は10.0gであった。収率は0.27396すなわち $2.75 \times 10^{-5} g / ml$ であった。

実施例 4

アロエベラ中抽出物（アセマンナン）中のシュウ酸カルシウム夾雜物の減少

アロエベラゲルからアルコールによってアセマン

ナンを抽出する工程の間に、少量の有機及び無機の物質が生成物と共に共沈澱するのが認められる。無機塩の大部分で、しかもアロエベラゲルからのアセマンナンのアルコールでの抽出における更に主な夾雜物は、シュウ酸カルシウムである。シュウ酸カルシウムの存在は、光学顕微鏡、赤外線スペクトル及び熱重量分析より確められる。シュウ酸カルシウムの量はパッチごとに変化し得るもの、全抽出物の約30重量%を成すシュウ酸カルシウムが認められた。実施例4に記載された工程の目的は、アセマンナン中のシュウ酸塩含量を減少させることである。シュウ酸カルシウムは、水及びアルコール中で非常に溶けにくい。アロエゲルをアルコールで処理することにより、カリシン沈澱物中のシュウ酸塩が濃縮される。このシュウ酸塩の濃縮は、シュウ酸塩のカルボニル非対称濃縮に起因する $1800\text{--}1587 cm^{-1}$ の間のカリシンの強い赤外光吸収、及びその熱重量分析によるカリシンの高い灰分含量によって明示される。アセマンナンはカリシン中の活性物質であるので、生成物の品質の一貫性及び健康に関する理由のために、シュウ酸カルシウムのような無機塩は除去または少なくとも最少量とすべきである。

シュウ酸塩及び他の無機塩を分離するための一つの方法は、膜透析によるものであろう。しかしながら、この方法は多くの欠点及び不利益を有する。この方法は、粗製カリシンを再水和し、アルコールで再抽出し、再び凍結乾燥しなければならないので、時間を非常に浪費する。非常に重

サンプル番	0	1	2	3	4	5	6	7	8
重並（ゲル）	100.0	100.0	99.8	100.0	100.0	95.7	100.0	99.9	99.5
pH	4.58	4.07	2.45	3.36	5.08	10.6	6.16	7.0	8.58

各サンプルのpHを調整した後、4体積のSDA-3Aエタノールを、ゲルが規定のpHのもとでいる時間を最小限にするために、できるだけ早く加えた。混合物の2分間未満の搅拌の後、各混合物を約3~4時間放置した。次に各抽出物を遠心分離し、凍結乾燥し、種々のpH条件下での収率を測定するため、秤にかけた。

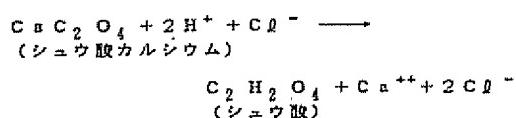
九つの固体のカリシンサンプルの赤外光スペクトルは、適量の物質を臭化カリウム中に混合することによって作られたディスクより得られた。各ディスクに、アイビーエム（IBM）型フーリエ変換赤外分光計（FT-IR spectrometer）にて、 $4000\text{--}400 cm^{-1}$ （波数）の走査を行った。種々のpH条件でのカリシンサンプルのスペクトルは、定量的に比較された。

熱重量分析

カリシンの熱的な重量損失は、明確な指紋特性を有する。各サンプル約10mgを、メトラー（Metler）熱分析機にて、 25°C から 780°C へ、 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で加熱した。温度が 600°C に到達するまでは窒素ガス雰囲気を、引き続き 780°C までは酸化条件を使用し、次に各サンプルがこの温度に2分間止まることを許した。重量損失温度分析図より、含

要なことに、透析段階で生成物が保存されなければ、細菌による劣化及び腐敗が、非常に不活性なカリシンを生じるであろう。

一般に、カルボン酸塩は薄い鉛板で処理すると、それらの効用する酸に転化する。シュウ酸カルシウムを塩酸で処理することにより、シュウ酸及びシュウ酸のカルシウム塩が、次の機構に従って生じるであろう。



シュウ酸は水及びアルコールに非常に良く溶け、それ故水/アルコール混合物中に優先的に抽出される。その結果、カリシンは、はるかに少量のシュウ酸塩及び他の無機塩を有する。

あらかじめ500psigで均質化され、新しい水泳プールフィルターを通して通過した、約2Lのアロエベラゲルを本実施例のために収集した。ゲルの初期は搅拌後に測定した。重量感知のゲルサンプルをいくつかの800mlのビーカーに入れ、適当な酸、ここでは希硫酸（好みしくは6N塩酸）、または溴水酸化ナトリウム溶液で、pHを適当に次のように調整した。

特表平2-503094(18)

水準、炭水化物、酸化され得る炭素骨格、シウ酸塩及び灰分の含量が求められた。

結果と考察

カリシンの酸処理で最も重要な要素は、物質の物理化学的特性が、この工程によって不利な影響を受けたかどうかである。適当な酸が選択されなければならない:(i)合理的な量にて適当なpH範囲(約3.0~約3.5)を達成する事が可能な酸、(ii)有効な成分(多分散系アセマンナン)、溶媒混合物(エタノール)及び収容する容器及び装置と不利な反応をしないであろうもの、及び(iii)更に、アセマンナン鎖を減成しないような濃度で選択される。多くの薄い鉛板及び高濃度の有機酸が適当であるが、非酸素化鉛酸が、エスチル及び減成が最少限となるので、最も適当である。適当な酸、例えば6N塩酸を選択すれば、不利な影響を受けるよりむしろ、カリシンの特性がより低いpH条件にてかなり向上するようである。例えば、同じ濃度(重量/体積)のカリシンは、酸で処理すると、より粘稠な再水和された溶液を与える。粘稠な溶液は、良い生成物を意味する。溶液のサイズ排除クロマトグラフィーによる分離は、非処理のカリシンと同じクロマトグラフ特性を示す。それ故、使用した条件下で、減成は観察されなかった。

次の結果は、ゲルの単位重量中の全固体分で表されるカリシンの収率は、酸処理の後に減少すると言うことを示す。

サンプルID	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	4.55	4.07	2.45	8.85	5.09	10.56	8.18	7.0	8.68
収率(%)	0.28	0.22	0.12	0.14	0.27	0.23	0.25	0.26	0.24

しかしながら、赤外線スペクトル及び熱重量分析による生成物の統計分析は、その高い収率がシウ酸塩及び灰分含量に明らかに関係していたことを示す。

赤外線スペクトルは広く、カリシンの定性的及び定量的特徴付けの両方に用いることが出来る。より低いpHでのカリシンの、約1740cm⁻¹に位置するアセチル基の吸収ピークの増大、及び約1590cm⁻¹のシウ酸塩のピークの減少は、シウ酸塩含量の減少を明示する(第B図)。

熱重量分析は温度と重量損失の特徴的なプロファイルを与える。一般に、純粋なカリシンは示差熱重量分析において、三つの主要なピーク:(a)水分80~100°C、(b)炭水化物(アセマンナン)200~400°C、及び(c)酸化され得る炭素骨格800~680°Cを示す(第9表)。一方、例えばシウ酸カルシウムで汚染されたカリシンは、高い灰分含量による450~600°C及び650°C~720°Cに位置するさらに二つのピークを示す(第10表)。

下記の第1A~E表は、種々のpH条件でのカリシンの熱重量分析結果を示す。

第1 A 表

カリシンの熱重量分析結果(pH4.50)

サンプルID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シウ酸塩	
					425	631
70802	9.7220	0.0122	17.8940	49.9485	10.2880	12.14
70807	8.8020	0.0803	18.0750	51.1304	9.7804	11.84
70811	10.1150	6.7721	18.6030	51.8980	8.6604	11.38
70812	9.1790	0.0847	18.4830	52.4889	8.7700	10.89
70813	8.9810	5.2087	18.6300	52.0124	8.9522	10.85
70814	9.4580	4.7287	18.5180	52.0994	9.4785	12.19
70816	9.6000	5.4271	17.7810	52.5517	9.1771	12.10
70820	9.9120	5.8094	17.0000	54.7322	8.0259	10.62
平均(X)	9.4705	6.0089	18.0873	52.1709	9.2211	11.49
標準偏差 N=8	0.4570	0.8991	0.0325	1.4205	0.6087	0.65

第1 B 表

カリシンの熱重量分析結果(pH3.60)

サンプルID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シウ酸塩	
					425	631
70315	8.2100	0.0184	7.7059	72.4104	5.6243	4.082
70321	10.7180	0.5777	9.0035	70.1716	6.4751	4.879
70323	9.3070	0.0277	7.9295	73.5680	6.1467	3.600
70324	9.0910	5.2600	0.0739	74.6780	5.0020	3.707
70326	9.6950	7.0397	10.1080	70.0355	6.4879	5.796
70327	9.1490	5.7493	9.5639	69.4942	6.6455	5.224
70328	9.4680	5.5450	0.3333	68.0317	9.5902	4.393
70329	8.3140	6.4204	0.6859	71.6130	5.6937	4.402
平均(X)	9.4940	6.1939	8.5491	71.3503	6.3307	4.548
標準偏差 N=8	0.5303	0.6478	1.0118	2.0730	1.4527	0.708

特表平2-503094(18)

第1C表

カリシンの熱重量分析結果(pH3.20)

サンプル ID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩 425 631 540C 750C	
70330	9.3200	3.5814	6.2021	77.1819	5.7152	3.506
70331	9.8330	4.6273	4.5764	80.7280	4.9425	1.871
70334	10.8360	6.1831	5.0388	77.0395	4.8819	2.085
70401	8.1040	7.8195	4.8018	80.3070	4.9975	2.023
70402	8.0650	4.0927	4.6222	79.4300	6.8205	1.522
70403	9.9490	4.2014	4.3220	80.1990	4.7945	2.472
70405	8.8930	6.0497	4.6353	79.1638	4.4305	2.089
70406	9.8350	4.3213	4.0874	80.9150	4.7708	1.9420
70419	9.0080	5.3619	2.1758	81.8822	4.7059	1.7651
70423	9.8510	8.6908	3.9285	79.8803	4.7102	2.0508
70426	9.7880	5.5685	4.1479	78.8307	3.9947	1.2073
70427	10.1010	6.7815	3.2670	79.5800	4.5144	2.0190
70428	10.7790	3.6101	2.6569	80.1190	4.4717	2.7368
70431	9.9030	5.6681	4.1098	78.4407	4.5542	2.3031
70433	8.3980	6.2277	3.5127	79.5073	4.5844	2.2902
70434	8.7360	7.1385	4.0188	77.1878	4.5604	2.5781
70440	10.0850	5.3148	3.1730	81.4331	4.4522	1.9534
70442	8.9470	8.2633	3.3778	81.0805	4.4234	1.2567
70504	9.9740	0.2933	4.7925	77.1410	4.7323	2.8173
70505	9.1440	5.9165	3.0308	80.5337	4.4102	1.4545
70506	10.2590	5.5659	3.4214	78.8573	5.9460	1.9300
70514	10.2000	7.7400	5.5164	74.4401	5.2714	4.0656
平均(X)	9.6627	5.7172	3.8581	79.2956	4.8504	2.2145
標準偏差 N=22	0.0551	1.2332	1.3388	1.7546	0.6180	0.6831

リサイクルされたカリシンの熱重量分析結果(20分間搅拌)

サンプル ID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩 425 631 540C 750C	
70515	9.8270	8.6401	8.4739	88.5359	6.0141	8.4109
70518	9.0530	5.5050	5.3753	76.3485	5.0638	2.8041
70519	10.4880	3.4134	8.1998	88.3159	5.9407	8.4838
70523	9.5570	3.2855	6.0013	60.6212	5.9642	7.3663
70526	9.8250	5.8321	8.1029	74.7279	4.8851	3.1959
平均(X)	9.9300	4.8954	7.8026	70.9099	5.5714	5.2902
標準偏差 N=5	0.3437	1.5944	1.5611	4.1270	0.5990	2.0401

第1E表

リサイクルされたカリシンの熱重量分析結果(40分間搅拌)

サンプル ID	重 量 (mg)	H ₂ O (%)	残 分 (%)	炭水化物 (%)	シュウ酸塩 425 631 540C 750C	
70520	9.0900	5.7060	8.1197	77.7105	4.7978	2.833
70529	9.2960	7.0996	4.9699	75.8714	4.5611	3.001
70535	9.7970	8.5428	4.3483	79.3609	4.2462	1.194
平均(X)	9.5043	6.4486	5.1460	77.6500	4.5250	2.182
標準偏差 N=3	0.2638	0.7011	0.8987	1.7457	0.2627	0.922

第2表

カリシンの品質に対するpHの影響(TGA法)

pH	2.45	3.85	4.07	4.58	5.00	8.18	7.00	8.68
水 分	6.6782	8.2483	8.9760	8.4035	8.6905	8.8431	8.9818	9.7702
アセマンナン	78.926	69.930	46.029	38.851	37.049	38.795	36.698	38.816
炭素骨格	17.812	15.455	12.840	12.846	12.969	12.508	11.485	10.769
シュウ酸	0.4890	4.8160	9.7966	10.870	10.261	10.347	11.725	10.148
カルシウム								
灰 分	1.8044	3.8494	18.811	15.989	18.847	17.908	17.182	17.188
收率(%)	0.12	0.14	0.22	0.26	0.27	0.25	0.26	0.24

カリシン(全固形分)收率、シュウ酸カルシウム、灰分含量及び水分は、pHが4~5に上昇すると共に増加するよう見える。しかし、アセマンナン及び対応する炭素骨格は、pHが下ると共に増加する。それ故、もし灰分及びシュウ酸カルシウム含量を減少すべきであるなら、4.0より高いpHは推奨されない。0.2%より高いカリシンの收率は、シュウ酸カルシウム汚染について分析されねばならない。

アロエベラゲルを適当な酸、例えば薄い鉛酸、好ましくは塩酸で処理してゲルのpHを8.0~8.5の間に調整し、続いてエタノールで抽出することは、シュウ酸塩の量の有意な減少をもたらす。この工程により、シュウ酸カルシウム及び灰分含量の両者を、80%より多い程度だけ減少し得る。この処理はまた、物理化学的分析方法によって示され

たように、ポリマーの分解を伴うことなく、活性カリシンの量を濃縮する。

カリシンのバッチ二つを、実施例1の記載のようにして、但し、エタノールによる沈殿に先立ち、pH3.0に酸性化する追加的工程を用いて、作った。#70816のロット中で、均質化されたアロエベラゲル20ガロンに濃硝酸(81ml)を加えた。#70821のロット中で、均質化されたアロエベラゲル45ガロンに濃塩酸(171ml)を加えた。収量はそれぞれ55.0g(0.075%)及び188.0g(0.11%)であった。IR及びTGAによる化学的分析は、両バッチが似かよった品質及び減少したショウ酸カルシウムを有することを示した。これら二つのバッチの分析結果は、第1B表中に含まれている。

硝酸は、塩酸または他の任意の適当な酸と同様、専ら酸性化のために用い得ると言ふことが、当業者に明らかとなつたであろう。

カリシンの特徴付け

薬物のスクリーニング技術を用い、アロエベラより抽出されたポリサッカリドが、アロエベラ中の活性化学物質であることが今、見出された。このポリサッカリドを以下、アセマンナンと呼ぶ。アセマンナンは実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの、秩序正しい線形ポリマーである。他の成分、例えばタンパク質、有機酸、アントラキノン類、ビタミン及びアミノ酸は、カリシンの1%より少ない量を構成する。アロエベラ中のカリシンの濃

度は、アロエベラジュースの約0.05~0.3重量%であることが見出された。収率又は液中のカリシンの濃度は、葉の成熟度に依存する。

アセマンナンがアロエベラ中の活性化学物質であることを証明する薬理学的データーは、次のように要約することができる。

1. アセマンナンの投与量・効果(dose-response)は、等量のアセマンナンを含むアロエベラジュースと同じであった。
2. アセマンナンは、さまざまな投与ルートすなわち静脈内、腹腔内および経口投与によって潰瘍保護モデルにおいて有効であった。
3. アセマンナンは、薬理学的モデルの両者における効果の100%を成す。
4. 全く異なる源、コンニャク(konjac)植物からのアセマンナンに類似する物質である化学物質グルコマンナンは、いくつかの薬理学的作用を示した。

カリシンは、やけど、潰瘍その他の皮膚及び胃腸管壁の創傷の治癒に対して関係することが知られている組織培養における纖維芽細胞の複製を48時間で800%まで増加することが実験室の研究で示された。

カリシンはまた、樹脂芽細胞の液中のDNA合成を増加することが示された。そしてDNA合成の増加は、治癒プロセスにおける基礎的なステップである代謝活性及び細胞複製の速度を大きくする。

粉末化したカリシンの製造において熱と時間が重要なファクターであることがわかった。熱はカリシンの加水分解もしくは分解を助長し、所定の温度におけるカリシンの加工時間が長くなればなるほど分解が多くなる。従って、高分子量のカリシン粉末が望ましい場合には、アロエベラの葉全体からカリシンを最も早く抽出することができるプロセスを使用することが好ましい。低分子量のカリシン粉末が望ましい場合には、アロエベラの葉全体からカリシンを最もゆっくり抽出することができるプロセスを使用することが好ましい。

0.2~1%の重量/容積濃度のカリシン粉末を再水和すると、新鮮なアロエベラのような粘稠な“ゲル”が再び形成された。カリシン粉末の再水和によって復縫するこのゲルのようなコンシスティンシーは、カリシンの高分子量ポリサッカライドの性質を示している。一般に、ポリサッカライドは分解または加水分解されるとその粘度が低下する。従って、再水和したカリシン粉末の粘度が品質の優れた表示を与え、品質保証のパラメーターとして使用されることができる。

本発明のプロセスに従って製造されたカリシンは、実質的にアセチル化されたマンノースモノマーの、好ましくは相互にβ(1→4)結合によって結合された実質的に非分解性の線状乾燥された線状ポリマーとして特徴付けることができる。

本発明の開示された組成物のさまざまな改変ならびに代

カリシンは動物の治癒速度を増大することが解説された研究において示された。

カリシンはまた、動物の研究において胃潰瘍の有効な治療剤であることが示された。その胃がヒトの胃と同様に反応する実験室用ラットが3年間に亘って試験された。カリシンは、胃潰瘍の治療に使用されている現在の医療と同様もしくはこれより優れていることが見出された。このような製品の多くのものは、胃内の塩酸を抑制するように作用する。カリシンは異なる原理に基づいて作用し、消化酸の自然の流れを変えるものではない。

上記の通り、カリシンは、液化したアロエベラゲルに水溶性低級脂肪族極性溶媒、好ましくはエチルアルコールを加えることによって析出させることができる。カリシンの粉末は次に凍結乾燥することによってつくることができ、所望により、この凍結乾燥製品をモウリネットスコーピーラインダー(Dillard's)から入手できる)のような粉碎装置を用いて粉碎し粉末にすることができる。カリシンの粉末は、高密度に電離性であり、何らかのアントラキノン化合物の酸化状態に依存して黄ばんだ白色からピンクないし紫色の無定形粉末である。カリシンは、加水分解を引き起す水を除去する凍結乾燥によって安定化され実質的に非分解性となる。所定量のカリシンを含む凍結乾燥されたアロエベラゲルは、その有効性を2年間保持した。凍結乾燥した形のカリシンは10年まで安定であると考えられる。

替的改変、変形及び均等物は上記一般的な説明を読めばこの技術分野の当業者に明らかにならう。次の実施例（実施例5～8）は、カリシンをさらに特徴付けかつ同定するために行われた。以下の実施例は例示的なものであって、上記の改変、均等物もしくは変形をカバーする添付されたクレームの範囲を制限することを意図したものではない。

実施例 5

カリシンの分離、精製及び特徴付け

A. カリシンの分離

アロエの葉を洗浄、スライスして開き、切り分けた。汚れのない内側のゲルを保持し、一方、緑色の外皮及び乳樹脂物質を捨てた。切り分けた物質を均質化し、フィニシャーモデル75 (Finisher Model 75, FMC, イリノイ州シカゴ) で強く通過し、バルブの殆どを除いた。その透明で粘稠なゲルを、希塩酸で約pH3.20に酸性化して、通常存在するカルシウム及びマグネシウムのショウ酸塩及び乳酸塩を、それらの対応する水溶性の酸へと可溶化させた。次に酸処理したゲルを、透流速度にて四液体の95%エタノールで4～5時間抽出した。浮遊している繊維を除去し、次にアルコール／水混合物を吸い上げ、一方、固体分沈没物を遠心分離によって収集した。殆どの、アルコール／水に可溶性の物質例えば有機酸、オリゴ糖、単糖類、アントラキノン類及び無機塩が、この工程において除去された。次に固体分を新鮮なアルコールで洗浄し、遠心分離、凍結乾燥し、静いて白い無定形の粉末とした。

C. 分子量測定

導入部：

アセマンナン (AM) は植物より抽出されるポリサッカライドである。このものは多分散であり、そのことはこのものが1より多い分子量サイズから成ることを意味する。

目的：

この研究の目的は、サイズ排除クロマトグラフィーにより、アセマンナンの分子量分布を測定することである。

試薬及び器具：

0.05%アジ化ナトリウム

標準：

0.05%アジ化ナトリウム中、Pillulan 853K, 100K及び12.1Kダルトンの各標準を 0.2% (重量／体積)

機器：

高速液体クロマトグラフィー、モデル690 (ウォーターズ・アソシエーツ社 (Waters Associates, マサチューセッツ州ミルフォード) 製)

示差屈折計 (Differential refractometer) モデル1770 (バイオ・ラド社 (Bio-rad) 製)

膜分光 S P 4290 [スペクトラ・フィジクス社 (Spectra-Physics) 製]

サンプルの調製：

テフロンで裏打ちしたキャップ付きのガラスびん (105×25mm) 中に、カリシン20mgを秤り取った。

0.009%アジ化ナトリウム10mlを加え、ジュニア・オー

B. 精製

この段階におけるカリシンは、一般にタンパク質、单糖類、オリゴ糖及び無機塩によって汚染されている。これらの夾雜物は生成物の生物活性に影響を与える、それ故、製造されたバルクの物質に対しては、さらなる精製は必要でない。しかしながら、カリシンの特徴付けにおけるさらなる工程として、さらなる精製工程を加えた。上述の夾雜物は、バルクの粉末をリン酸塩緩衝液に再溶解し、それを非特異的プロテアーゼ (シグマロット #5147) で処理し、続いて広範な透析によって除去することができる。その後過不能な生成物 (このものは主にアセチル化されたポリマンノースである) を凍結乾燥し、第11図に示したように、赤外線スペクトル、熱重量分析 (TGA), HPLC, GLC 及び GC/MS を包含する多くの分析法によって特徴付けた。

アロエベラ生成物の認定には、HPLC 及びGCが推奨される。ガス液体クロマトグラフ (GLC) 法は、アロエベラゲル抽出物中のマンノースの分離及び定性に用いられる。生成物へのマンノースの混入を防ぎ、より高いアロエベラゲル含量を持つであろう製品を作るために、透析工程を加えても良い (分子量カットオフ12,000～14,000)。さらに、ローカスト豆ガム、ゲーガムまたはグルコマンナンの混入は、マンノースに対するガラクトースまたはグルコースの高い比率によって感知される。

ビット振とう機 (Junior orbit shaker, ラブ・ラインインストラメンツ社 (Lab-line Instruments, イリノイ州メルローズパーク) 製) 中で振りませる (4時間) ことにより、溶解した。

1.2 μmメンブラン [Acrodisc (商標), グルマンサイエンシーズ社 (Gelman Sciences) 製] を通して汎過。汎液をHPLC中への注入のために貯えた。

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 条件

カラム：Sphero gel TSX 5000 PHHR (Beckman Instruments) 製

検出器：示差屈折計 (Differential refractometer) (バイオ・ラド社製)

移動相：0.05%アジ化ナトリウム

流速：40°Cで1 ml/分

注入量：50 μl

結果：

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、ブルラン (Pillulan) ポリサッカライドを標準として測定すると、アセマンナンは、10,000ダルトンより大きいポリマーを少なくとも73%含む多分散ポリサッカライドである。第12図は、概算の分子量：それぞれ 853K, 100K及び12.1Kダルトンのブルラン (Pillulan) 標準の、SECクロマトグラムを表す。対応するカリシンのクロマトグラムを第13図に示す。そのクロマトグラムでは、A, B, Cと標識された三本の主ピーク部分が独立っている。ピークAは

特表平2-503094 (22)

100,000 ダルトンより大きいアセマンナン画分を表し、ピークBは10,000ダルトンより大きいがしかし100,000ダルトンより小さい画分である。ピークCはより低い分子量の成分を表す。ピークA及びBの合計が、活性画分を構成する。

D. 赤外 (IR) 分光分析

導入部：

アセマンナン(カリシンの活性な製品)の官能基は、特徴的な赤外振動数にて吸収する。赤外線スペクトルはそれ故、この物質を特徴付ける重要な方法である。

目的：

この研究の目的は、赤外分光法により、カリシンをさらに特徴付けることである。

試薬及び器皿：

赤外等級の臭化カリウム(KBr)粉末[マリンクロット社(Mallinckrodt Inc., ケンタッキー州パリ)製]

機器：

IBM 9000コンピュータ及びプリンター／プロッターを備えたIBMフーリエ変換赤外(Ft-IR)分光器モデルNo.32

サンプルの調製：

ウェリー・ミル(Wiley Mill, トーマス・サイエンティフィック社(Thomas Scientific Co.)製)及び80メッシュサイズより小さい粒子を通過させるふるいにより、カリシンを微細な粉末に予備粉碎した。

波 数 (cm^{-1})	帰 痛
1080.8	ピラノース環構造のC=O伸縮
8422.1	O-H伸縮
1250.0	C-O-C伸縮(アセチル基)
1740.0	C=O伸縮(アセチル)
1877.3	C-H曲げ
1849.8	C=O伸縮(アミドI)
530.5	内部回転モード他
599.8	内部回転モード他
2928.3	C-H伸縮
1541.8	N-H変形(アミドII)
800.0	—
807.0	環上のC ₁ のアキシャルH
773.8	環の微動

カリシスのスペクトルは、約8422 cm^{-1} に、O-H伸縮に帰因する強い吸収を示すことが留意される。アセチル基のカルボニル及びC-O-C伸縮はそれぞれ1740及び1250 cm^{-1} 付近に位置する。C-O-C系の強いシングルバンドは、O-アセチル基がモノマー単位にエクアトリアルに結合していることを示す。水分の吸収ピーク及び約1541 cm^{-1} のN-H変形(アミドII)上に重なった約1849 cm^{-1} のアミドカルボニル伸縮(アミドI)は、タンパク質／プロテオグリカン不純物に帰因する。

800～730 cm^{-1} の間の吸収バンドは、アセマンナンの成る立体化学的特徴と関連付けることができる。例えば、

予備粉碎したサンプル5mgを乾燥KBr 495mgと混合して、合計500mgの混合物とした。

その混合物を、メノウ乳鉢及び乳棒を用い、手で再び粉碎して、均一な物質とした。

代表的なサンプル(80～100mg)を、油圧ジャッキ(商標Walker)を用い、40,000psiの圧力にてプレスして透明なディスクとした。

ディスクは4000 cm^{-1} から400 cm^{-1} まで走査した。シグナル対ノイズの比を向上させるため、分解能4 cm^{-1} にてマルチ走査(30走査)を行った。

結果：

第14図に示したスペクトルの分析結果では、次の特徴的な吸収ピーク振動数(cm^{-1})が挙立っている。

844 cm^{-1} 付近のエクアトリアルC₁-Hに帰因するバンドがなく、807 cm^{-1} 付近のアキシャルC₁-Hが存在することは、既アセマンナンがB結合していることを示す。環の振動(955 cm^{-1} のショルダー)及び約773 cm^{-1} に位置する環の微動は、ペーク・グリコシド結合を持つD-マンナンを示す。

下の第3表は、強度に従って並べられた対応する吸光度を有するピーク吸収振動数を示す。

第 3 表
プロテアーゼ非処理のカリシンのピーク吸光度振動数

ピークNo.	ピーク	ピークの 初まり	ピークの 終り	吸光度
1	1068.8	1201.8	1049.4	0.548
2	9422.1	9433.7	9410.0	0.474
3	1250.0	1848.4	1201.8	0.439
4	1740.0	1821.0	1699.5	0.433
5	1977.8	1410.1	1350.5	0.343
6	1840.8	1897.0	1585.7	0.325
7	580.5	582.8	493.8	0.313
8	599.0	634.7	588.4	0.282
9	2928.8	2995.8	2809.4	0.242
10	1541.3	1561.8	1527.8	0.228
11	808.3	885.3	789.0	0.224
12	897.0	920.2	848.0	0.210
13	773.6	787.1	760.4	0.207

E. プロテアーゼ処理したカリシンの赤外線スペクトル
バルクのカリシンの赤外スペクトルは、アミドI及びアミドIIピークの存在によって示されるように、タンパク質またはプロテオグリカン不純物の痕跡を示す。タンパク質またはプロテオグリカンを加水分解する非特異的プロテアーゼ、引き続いで広範な透析による、バルク物質のさ

第 4 表
プロテアーゼ処理したカリシンのピーク吸光度振動数

ピークNo.	ピーク	ピークの 初まり	ピークの 終り	吸光度
1	1084.8	1093.8	1049.4	0.949
2	1092.0	1045.5	970.8	0.986
3	9422.1	9485.8	9404.8	0.814
4	1248.1	1348.4	1201.8	0.720
5	1740.0	1888.4	1895.8	0.879
6	1977.3	1408.9	1350.3	0.593
7	580.5	545.9	493.8	0.515
8	598.0	577.1	588.4	0.532
9	1639.7	1895.8	1664.8	0.481
10	2928.3	2900.0	2903.2	0.428
11	897.0	918.2	887.4	0.409
12	808.3	835.3	790.9	0.400
13	771.8	789.0	748.5	0.987

吸光度の値は、定性的なものであり、また、サンプルディスクの製造において同じ温度を用いる企図がなされなかったので、第14図のプロテアーゼ非処理のカリシンと強度を比較しえない。

赤外線スペクトルのみに基づけば、カリシンはO・アセチル基側鎖を有する、本質的にB結合したD・マンノース

らなる精製は、これらの不純物を除去した。

プロテアーゼ処理したサンプルのスペクトルを第15図に示す。このスペクトルの分析結果は、第14図のプロテアーゼ非処理のカリシンと比べ、いくつかの相違を示す。例えば、第14図中の約1649及び1541cm⁻¹に位置するアミドI及びアミドIIのピークは、プロテアーゼ処理したサンプルには存在しない。さらに、約1680.7に位置する水分の吸収ピークが、明確に分割されている。第4表は、プロテアーゼ処理したカリシンの数を強度に従って並べた対応する吸光度と共にピーク吸収振動数を次のように示したものである。

のポリサッカライドである。N・アセチル基の存在はプロテイン/プロテオグリカン不純物に帰因するのであろう。

F. カリシンの熱重量分析 (TGA)

導入部：

熱重量分析 (TGA) は、ポリマーの研究のための重要な分析法である。温度変化の結果としてのポリマーの分解における重量損失は、そのポリマーに特徴的なものである。さらに、TGAは粉末化された物質の水分 (H₂O) 及び灰分含量の測定を助ける。

目的：

本研究の目的はTGAを用い、カリシンをさらに特徴付けることである。

試薬及び器具：

なし

機器：

1. T C 10 A評価及び制御コンピュータ (Evaluation and Control Computer) と、M 3 - 03ミクロ天秤を有するT G 50炉とを特徴とする、メトラー熱分析機 (Metler Thermoanalyzer) TA 3500システム。

2. プリンター/ブロッター、モデルMP 3 (プリントスイス マトリックス社 (Print Swiss Matrix) 製)

3. ファイル記憶のための IBM PC

サンプルの調製及び分析：

70mlのアルミナルツボ中に、サンプル10mgを、ミクロ天秤にて、±1 μgの精度で計り取った。

第 5 表

カリシンの T G A 分析結果

サンプル番	重 量 (mg)	H ₂ O	灰分*	アセマンナン	CaOx
	%	%	%	%	%
1	9.4390	7.3631	3.8034	82.2119	2.5532
2	9.5060	7.3649	4.0163	81.8381	2.7540
3	9.5210	7.4992	4.2012	81.7568	2.9514
4	9.4530	7.7118	4.1786	81.2010	2.9820
5	9.4090	7.7891	3.8793	81.5072	2.9546
6	9.5960	6.8874	3.9912	82.0969	3.1578
7	9.4740	7.6209	4.1904	81.6065	2.8805
8	9.5730	7.3436	4.2411	81.0719	3.3218
9	9.5550	7.9435	4.1130	80.9852	3.2444
10	9.5220	7.7715	4.3373	80.8023	3.1811
平均 値**	9.5128	7.5255	4.0952	81.5238	2.8920
(X)					
標準偏差	0.0628	0.3087	0.1688	0.4864	0.2353

*該灰分含量は、Ca(1.51), Si(0.1), Na(0.55), Mg(0.37), Fe(0.02)及びAl(0.00)の酸化物より成る。

**この処理ではベースピークの2%より少ないピークを考慮していないので、平均値は合計100%とならないであろう。

ルツボを、その内容物と共に T G 50炉中、温度プログラム速度20°C/分にて加熱した。この加熱速度は該物質を分析するために標準的であり、かつ十分である。

加熱は、25°Cから800°Cまででは空素ガス雰囲気中で601°Cから780°Cまでは空気(酸化剤)雰囲気中で行った。

さらに2分間、温度を最後の温度に保った(780°Cの最高温度は、有機及び無機物質の両者が、この温度に到達するまでに分解する故に、選ばれた。)。

結 果 :

カリシンの分解プロフィールは特徴的である。第18図はカリシンの分解プロフィールの実時間のプロット及び対応する一次微分プロットを示す。アセマンナン(カリシンの活性物質)の分解パターンは、他のポリサッカライドのそれと異っている。例えば、同一の操作条件下で、アセマンナンの主な分解が起こる温度は、セルロース、デキストランまたはアミラン(Amylum)のそれと異っている。アセマンナンに関する質量損失は、200~300°Cの間に位置する。カリシンの分解の大半は、200~540°C及び800~830°Cの間で起こっている。アセマンナン画分は、これら二つの温度領域の寄与により決定される。一方、灰分及び水分は共に約10重量%寄与する。下の第5表は、T G Aによるカリシンの繰り返しの分析結果を示す。

この分析法は、定性性ならびに半定量的である。例えば、アセマンナンパーセントは次のようにして決定することが出来る。

$$1. \text{ AMパーセント} (\%) = \frac{\text{mg (200~830°C)}}{\text{mg (サンプル)}} \times 100$$

または

$$2. \text{ AM パー}\% = \frac{\text{mg (200~830°C) サンプル} \times 100}{\text{mg (200~830°C) リファレンス標準}}$$

水分及び灰分含量は、粉末化された薬剤物質において、重要なパラメーターである。これらのパラメーターは、熱重量分析法を用い、容易に測定される。

G. 脱水解及び高濃液体クロマトグラフィー

(HPLC) によるカリシンの糖成分の決定

導入部:

ポリサッカライドを、酸または酵素加水分解により、その構成モノマーに加水分解した。2Mのトリフルオロ酢酸(TFA)は、グリコシド結合を加水分解するのに十分強いが、しかし硫酸と異り、十分に程かでモノマーの糖残基を破壊しないので、加水分解のために選択された。

目的:

カリシンのアセマンナン画分のモノマーの糖成分を決定することが目的である。

試薬及び用品:

- 内部標準としてイノシトール 0.5mg/ml を含有する 2M TFA

2. イソプロパノール

機 器:

- 自動サンプリング採取器 HP 79842 A 及び自動インジェクター HP 79841A を備えた HPLC モデル 1084B [ヒューレット・パッカード社(Hewlett Packard) 製]

- バイオ・ラド社製示差屈折計モデル 1770

サンプルの調製:

秤量紙上にカリシンを正確に 2.0mg 秤り取り、テフロンで裏打ちされたキャップを持つ、13 × 100mm の使い捨て培養管に定量的に移した。

内部標準としてイノシトール 0.5mg/ml を含有する 2M TFA 1ml を加えた。

管を加熱ブロック [ハイセル社(Hydel) 製熱ブロック(Thermal Block)] 中に 120°C で約 1 時間置いた。

その加水分解物混合物を、乾燥空気で、乾燥するまで蒸発させた。

その固形分をイソプロパノール 1 ml に再分散し、乾燥空気で乾燥するまで蒸発させた。

HPLC カラム中への注入のための準備として、固体を脱イオン水 1 ml 中に溶解した。

HPLC 条件:

カラム: Minex Carbohydrate HPX-87P [バイオ・ラド社(カリフォルニア州リッチモンド) 製]

移動相: 脱イオン水 (80°C にて)

流速: 0.6ml/min

オープン温度：40°C
 チャートスピード：0.2 cm/分
 换出器：Refractive Index (バイオ・ラド社製、
 #1770)

溶 剤：2

結 果：

第17図は、グルコース、ガラクトース、マンノースそれぞれ1 mg/ml、及び内部標準としてイノシトール 0.5 mg/mlを含む標準混合物のクロマトグラムを示す。第18図は、同一条件下のカリシンのクロマトグラムを示す。マンノースがポリマーの生成物であることが認められ、ポリサッカライドが本質的にマンノース糖単位から成ることを示している。

H. 気-液クロマトグラフィーによる、カリシンの分離及び定量

導入部：

カリシンのポリサッカライドは実際、主として中性である。中性のポリサッカライドは、気-液クロマトグラフィー (GLC) により、そのグリシトールアセテートとして、より良く分析される。

目的：

本研究の目的は、糖モノマーをそのグリシトールアセテートとして、分離及び定量することによって、カリシンをさらに特徴付けることである。この手法では、グリシトールアセテートはキャビラリーカラムで分離され、炎イ

含有する 2 M) 500 μl を加え、120°Cで約1時間加熱 (ハイセル社製 Thermo Block) した。

空気流の下で TFA を除去し (40°Cの水浴)、残分をイソプロパノールで洗浄して残った酸を除去した。

還元：

残分を、重水素化ホウ素ナトリウム (NaB^2H_4) を 10 mg/ml 含有する 1 M NH_4OH (300 ml) 中に溶解し、室温で1時間放置した。

氷酢酸 (泡立ちがなくなるまで数滴) で過剰の還元剤を分解し、空気の下で溶媒を除去、残分を酢酸を 10% 含有するメタノール (3 × 300 μl) で洗浄し、最後にメタノール (3 × 300 μl) で洗浄した。

アセチル化：

乾燥した残分に、ビリジン 200 μl 及び無水酢酸 200 μl を加え、120°Cで20分間加熱した。

冷却した溶液にトルエン 500 μl を加え、空気の下で溶媒を除去、残分を水に溶解し、ジクロルメタン中に抽出した。

有機層を汚れのない管に移し、空気の下で有機溶媒を除去、GLC に先立ち、残分をアセトン (100 μl) に溶かした。

気-液クロマトグラフィー条件 (GLC)

カラム：SP 2330, 15 m または 30 m、内径 0.25 mm、液層厚み 0.25 μm [スペルコ社 (Supelco, Inc.) 製]

キャリアーガス：ヘリウム

オゾン化法により検出される。

試薬及び商品：

1. 内部標準としてイノシトールを 0.2 mg/ml 含有する 2 M TFA
2. イソプロパノール
3. 重水素化ホウ素ナトリウム (NaB^2H_4) または水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) を 10 mg/ml 含有する 1 M NH_4OH
4. 氷酢酸
5. メタノール
6. ビリジン
7. 無水酢酸
8. トルエン及びジクロルメタン
9. ガスクロマトグラフィー (GC) 等級アセトン

機 器：

1. ガスクロマトグラフ Vista 6000 (ヴァリアン インストルメントグループ (Varian Instrument Group, カリフォルニア州パロ Alto) 製)
2. 構分計 SP4290 (スペクトラ・フィジクス社 (Spectra-Physics, カリフォルニア州サンジョセ) 製)

サンプルの調製：

サンプル 2 ml を正確に秤り取り、テフロンで裏打ちされたキャップを持つ培養管 (13 × 100 mm) 中に移した。

加水分解：

トリフルオロ酢酸 (TFA, イノシトール 200 mg/ml を

オープン温度：235°C (等温)

インジェクション温度：250°C

注入量：0.5~1 μl (分割)

結 果：

第19図は、ラムノース、フコース、アラビノース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルコース、及びイノシトールの標準混合物をこれらのグリシトールアセテートとしての GLC クロマトグラムを示す。カリシンのクロマトグラムを第20図に示す。図中の主要なピークはマンノースに対応する。ガラクトース、グルコース、アラビノース、キシロース、及びフコースの痕跡が存在する。これらは、細胞壁夾雑物に由来するものである。最後のピークは、内部標準のイノシトールアセテートである。

マンニトールアセテートは、加水分解及びアセチル化された物質における主要な糖のピークであるので、カリシンは本質的にポリマンノースポリサッカライドである。

マンニトールアセテートのピークは、内部標準としてのイノシトールの助力で定義することが出来る。第21図は、概算の重量のアセマンナンに対して、マンノース/イノシトール面積比をプロットすることにより生じた標準カーブを示す。標準カーブを用い、所与のカリシンサンプル中のアセマンナンの量を計算することが出来る。

I. カリシンのガスクロマトグラフィー/マススペクトル、及びグリコシド結合分析

導入部：

ポリサッカライドは、糖単位が互いに結合する仕方を決定することによって特徴付けられる。ポリサッカライドの化学的、物理的、及び生物的活性は、糖が、ヘキソースの五つの可能な位置のうちのどこに結合するかに依存する。

目的：

本研究の目的は、カリシンポリサッカライドの糖単位が結合する仕方を決定することである。

試薬及び藻品：

1. 乾燥ジメチルスルホキシド (DMSO)
 2. ナトリウム=ジメチルスルフィニルアニオン (2M)
 3. ヨウ化メチル
 4. 2M TFA
 5. イソプロパノール
 6. NH_4OH の 50% アンモニア水メタノール溶液、10mg/ml (NaB^2H_4)
 7. 水酢酸
 8. 10% 酢酸メタノール溶液
 9. 無水酢酸
 10. 塩酸水素ナトリウム
 11. ジクロルメタン
 12. GC等級のアセトン
- 機器：
- ガスクロマトグラフ／マススペクトロメーター MSD (HP 5970)

GLC/MS 及びグリコシド結合分析

カリシンの結合的な特徴付けは、ポリマーの結合の分析を包含する。カリシンは、ダルビル (Darvill) 他により記載された [プラント フィジオロジー (Plant Physiology) 62巻 (1978年) 418~422 ページ、引用することにより、その開示をここに含める] 方法によって過メチル化され、マンノースに加水分解され、メチル化されたアルジトールアセテートに転化される。その揮発性の誘導体を、ヒューレット・パッカード社製 GC/MS システムで、スペルコ (Supelco) SP 2330 キャビラリーカラム ($30\text{m} \times 0.25\text{mm}$ 内径) にて分析した。マンノースの、メチル化グリシトールアセテートのフラグメンテーションは、電子衝撃 (EI) 法によって成された。部分的にメチル化され、かつ、部分的にアセチル化されたグリシトールとしての、誘導されたカリシンの全イオンクロマトグラム (TIC) を第22図に示す。部分的にアセチル化されたマンニトールのマススペクトルを第23図に示す。

全操作は次の通りである：

- (1) テフロンで真打ちしたキャップを有する管の中に、サンプル (1mg) を置き、真空オープン中、50°C にて乾燥した。
- (2) サンプルに乾燥 DMSO ($250\mu\text{l}$) を加え、サンプルが溶解するまで搅拌 (テフロン搅拌棒) した (超音波を役立てても良い)。管をアルゴン (または窒素) で満たした。

- (3) ポリサッカライド (DMSO 中) にナトリウム=ジメチルスルフィニルアニオン (2M) $250\mu\text{l}$ を加え、少なくとも 4 時間搅拌した (アルゴン下で反応を行わねばならない)。サンプルをアニオン溶液中に絶夜放置するのがより好都合であろう。
- (4) アニオン溶液を水中で冷却、ヨウ化メチル $200\mu\text{l}$ をゆっくりと加え、その溶液を約 1 時間搅拌した。
- (5) この溶液に、約 2.5ml の水を加え、過剰のヨウ化メチルをアルゴンで除去した。
- (6) この混合物を、 $13.3 \times 2.1\text{cm}$ (直径) の透析管 [分子量カットオフ 12,000~14,000、スペクトル メディカル社 (Spectrum Medical, Inc., カリフォルニア州ロサンゼルス) 製] に移した。
- (7) 透析不能な部分を、空気流 (50°C) 下で濃縮。
- (8) 乾燥した残分に 2M TFA $250\mu\text{l}$ を加え、120°C で 1 時間加热。
- (9) 空気の下で TFA を除き、残分をイソプロパノールで洗浄 ($2 \times 250\mu\text{l}$)。
- (10) 残分を、 NaB^2H_4 を $10\text{mg}/\text{ml}$ 含有する NH_4OH 50% アンモニア水メタノール溶液 ($250\mu\text{l}$) に溶解し、室温で 1 時間放置。
- (11) 過剰の還元剤を水酢酸 (数滴) で分解し、温熱して乾燥させ、残分を 10% 酢酸メタノール溶液で洗浄 ($3 \times 250\mu\text{l}$)。
- (12) 乾燥した残分に、無水酢酸 ($100\mu\text{l}$) を加え、サン

プルを 120°C で 3 時間加热。冷却したサンプルに水 (約 1.5ml) を、次に塩酸水素ナトリウムを、泡立ちが止まるまで加えた。誘導体をジクロルメタン中に抽出。

- (13) 有機層を濃縮して乾燥し、GLC 及び GLC/MS に先立ち、残分をアセトン $100\mu\text{l}$ 中に溶解。

GLC 条件：

カラム：SP 2330 滲膜シリカカラム ($30\text{m} \times 0.25\text{mm}$)

温度：170°C で 3 分間、次に $4\text{°C}/\text{分}$ で昇温し、240°C で 10 分間保持

検出器：FID

GLC/MS 条件：

カラム：SP 2330 ($30\text{m} \times 0.25\text{mm}$)

温度：80°C で 2 分間、170°C までは $30\text{°C}/\text{分}$ で、次に 240°C に $4\text{°C}/\text{分}$ で上昇させ、10 分間保持

MS：ヒューレット パッカード社製 MSD

メチル化分析による、サンプルの主要なグリコシド結合の決定

この操作において、ポリサッカライドの全ての遊離ヒドロキシル基を、メチルエーテルに転化する (段階 4)。メチル化したポリサッカライドを構成成分モノサッカライドに加水分解し (段階 8)、メチル化されたアルジトールへと転化し (段階 9) アセチル化する (段階 10)。これらの揮発性の誘導体を GLC/MS で分析し (段階 13) そのフラグメンテーションパターンから、アリジトール上の O-メチル及び O-アセチル基の位置が決定される。

例

1及び4位を通して結合しているグリコシル(マンノシル)残分〔すなわち(1-4)-結合したマンナン〕を考慮せよ。2、3及び6位のヒドロキシル基は遊離であり、メチルエーテルに転化されることが出来る。

加水分解及び還元すると、1、4及び5位のヒドロキシル基は露出され、アセチル化されて誘導体1,4,5-トリ-O-アセチル-2,3,6-トリ-O-メチルヘキシトール(第24図)を生じることが出来る。マススペクトルの手法による試験の際には、主要な第一のフラグメントイオンは、隣り合ったO-メチル基^{1,2,3,4}O-メチルと^{5,6}O-アセチル基の間の開裂によって作られる。第二のフラグメントイオンは、酢酸、メタノール等の損失により作られる(第25図)。第22及び23図はそれぞれ、カリシンの全イオンクロマトグラム、及び一部のアセチル化したマンニトールとしての4-結合したマンナンのマススペクトルを示す。

カリシンの全イオンクロマトグラム(TIC)及び結合分析に基き、カリシンは主としてマンノースの(1-4)-結合した線形ポリマーであると推定される。

実施例 6

32才の患者は“多年の間”潰瘍性大腸炎の歴史を持っていた。活発な症状の発現の間、彼女は40mgのプレドニゾン(prednisone)、30mgのアサルフィジン(Azulfidine)、50mgの6-メルカウトアリンおよびフラギル(Flagyl)からなる日々の処方に対して応答しなかった。彼女は腹部の

痛みを推測して有し、1日に4~8回血便があった。彼女は点滴を受けた。内視鏡の診断では、程やかな肝臓ないし横隔膜を伴う重い進行する結腸潰瘍を示した。この患者は、彼女の他の医師に加えて1日4回50mgのカリシンを投与され、遂に帰された。1週間で彼女の症状は実質になくなつた。この患者は現在この時間において単独の薬物としてカリシンを継続している。身体検査および症状は、全て正常であると記録されている。

潰瘍性大腸炎とクローン病(Crohn's disease)に同様の回答を示す5つの別のケースが認められた。一人の患者は、カリシンのカプセルを切らした。4週間で軽い症状が再発し始めた(程やかな腹部の不快感を伴つた排便が増えた)そして彼女は薬物の投与を再開した。3日で彼女は全体として正常な排便症状に戻つた。

実施例 7

多数のエイズの患者が、毒性または副作用を伴うことなく長期間カリシンの大量投与を受けた。これらのエイズ患者には、臨床症状の軽減および消滅ならびに感染の機会の減少を伴つて、T-4およびT-8リンパ球の比の上界お上げT-4の絶対数の上界が認められた。カリシンは患者において抗ウイルスもしくは免疫調節効果を有することが示唆される。

これらの患者のリンパ球に対する刺激が観察された。このことはカリシンが免疫調節に関与しているかもしれないことを示唆する。

実施例 8

カリシンの収率に及ぼすアルコール濃度の影響

操作:

ヒルトップの葉(15.9ポンド)を洗い、フィレット化し、ワーリングブレンダーで粉砕し、次いで8層の錦布で涙過した。次にこのゲルを4個の11クオートステンレススチール製パンに移し、冷たいU.S.Pグレードのエチルアルコールをそれぞれに容量比で2:1, 3:1, 4:1, および5:1の割合で加えた。その量は以下のように要約することができる:

比(エタノール : アロエゲル ゲルの量)	エチルアルコールの量
2:1	500ml
3:1	500ml
4:1	1670ml
5:1	500ml

析出物を4時間沈降させ、次いで残存するアルコール-ゲル溶液を注意深くデカントし、別の容器に替えた。この析出物をIECセントラ-7遠心分離機を用いて2800rpmで10分間遠心分離し、アルコールで洗浄し、次いで同じ条件で再び遠心分離した。ペレットを600mlのジャーに移し、液体窒素で凍結し、1晩凍結乾燥した。

2:1の比からの上澄み液に追加のアルコールを加え、室温で1晩沈降させた。残存する上澄み液も室温で放置し

1晩沈降させた。

翌日に、追加のアルコールで析出された2:1の比からのペレットを除き、先に述べたように上澄み液から析出物を集めた。この場合、ペレットを凍結乾燥ジャーに移す際に約5~10mlの水を加えた。

結果:はじめの4時間のアルコール析出の結果は、次のように要約することができる:

比(エタノール : アロエゲル ゲルの量)	収率% (カリシン/g/ゲルg)
2:1	0.0518
3:1	0.3847
4:1	1.945
5:1	0.6675

さらにエチルアルコールを加えた後、2:1の上澄み液はさらに170mgのカリシンを生成した。1晩沈殿させるだけにより、3:1および4:1の比の上澄み液は、それぞれさらに89mgおよび105mgを生成した。5:1の比は、最初に非難の後、ほとんど沈殿を生成しなかつた。従って再採集はしなかつた。

2:1の比からの2回目の析出(3:1)の場合に、凍結乾燥する前に5~10mlの水を用いて遠心バケットを満たす。これは、他のサンプルが生成した密度の高い灰色のカリシンサンプルとは著しく異なる低密度の白色のふわふわしたカリシンを生成した。

カリシンはアロエベラ粘液から抽出された、精製され

特表平2-503094(28)

カリシンは、10,000ダルトンより大きい分子量を有する物質の少なくとも70%で多分散されている。

物理的および化学的の性質：

(d) 溶解性:
カリシンは白ないしオフ・ホワイトの無定形粉末である。水にゆっくりと溶解して高粘度のコロイド溶液(0.4% w/v)になる。数時間勢いよく振りまぜると1% (w/v)の粘稠なゲルが得られる。カリシンはプロピレングリコールを含む一般的な有機溶媒には事实上溶解しない。しかし、20%およびプロピレングリコール80%には溶解して、今まで安定なままでいるためかで粘稠なゲルになる。

(b) pH:

0.2% (w/v) のカリシン水溶液は約 6.31±0.33 の pH を有する。

(c) 旋光性：

0.45 μm のメンブランフィルター〔ユニプロ(商標: Uniflo)、ニューハンプシャー州キーンのシュライシャー & シェル社(Schleicher & Scheull Inc., Keene, NH)〕を通過させることにより透明化したカリシンの0.2% (w/v) 水性溶液の比旋光度は:

()₅₈₉²⁰ = -20であり、これはB-結合を表している。脱イオン水をプランクとして用いた。

(d) アルカリ処理:

カリシンのアルカリ処理により、粘液性ジェリーを形成する能力を破壊する脱アセチル化が起こり、このことはカ

リシンのO・アセチル化が粘度に影響を及ぼすことを示している。脱アセチル化の生成物は水には溶けず、これは明らかに、増加した強い水素結合のためである。

(c) 赤外線スペクトル：

カリシンの官能基は赤外線スペクトルにより同定した(第14図および第15図)。 1740cm^{-1} および 1250cm^{-1} 付近の強いIR吸収帯はアセチル化を表す。約 3422cm^{-1} , 1066cm^{-1} , 1639cm^{-1} , 897cm^{-1} , 806cm^{-1} および 773cm^{-1} に位置する他の吸収はB-マンノシル結合を有するポリサッカライドの特徴的な吸収である。弱いアミドIおよびアミドIIの吸収がそれぞれ約 1849cm^{-1} および 1541cm^{-1} に位置し(第14図)、これらはタンパク質の不純物に由来するものである。というのは、カリシンをプロテアーゼで処理し、透析すると、これらのピークが無い(第15図)からである。

(1) 分子量分布:

カリシンは、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定したとき、10,000ダルトンより大きい物質の少なくとも73%で多分散されている。高压液体クロマトグラムの1例（第13図）は、A、BおよびCと符号を付した3つの画分を示している。ピークAは100,000ダルトンより大きいカリシンを表し、そしてピークBは10,000ダルトンより大きいが、100,000ダルトンより小さいカリシンを表す。ピークCはカリシンの分子量成分を表す。ピークBおよびCの面積はカリシンが分解すると増加し、そしてこのことはピークAの面積の減少を引き起す。

この技術分野の者には、本発明の広い教示および例示的な実施例から、好ましい列挙した化学品およびプロセス工程を、ここで挙げなかつた化学品および工程で置き換える可能性があることが容易に明らかとなろう。そのような挙げなかつた化学品および工程への旨及がなくとも、それらが本発明の範囲内にないことを示すわけではなく、この教示が簡潔および正確であることが必要であるという理由のみにより省略されている。

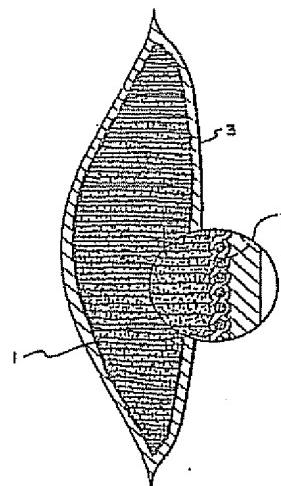


FIG. 1

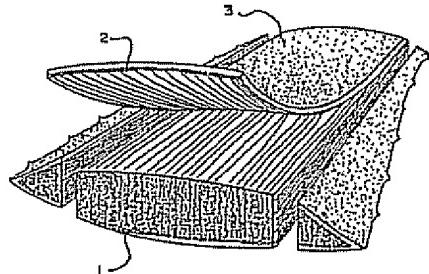
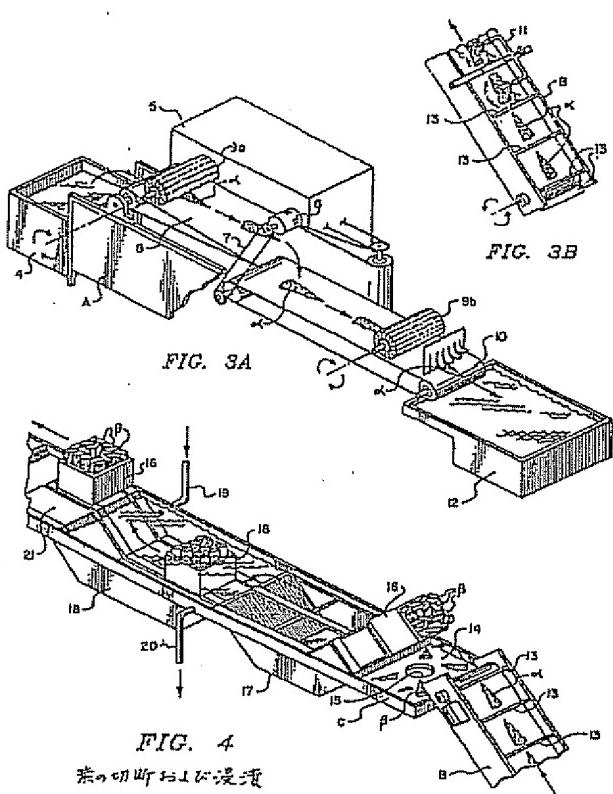


FIG. 2



Digitized by srujanika@gmail.com

卷之三

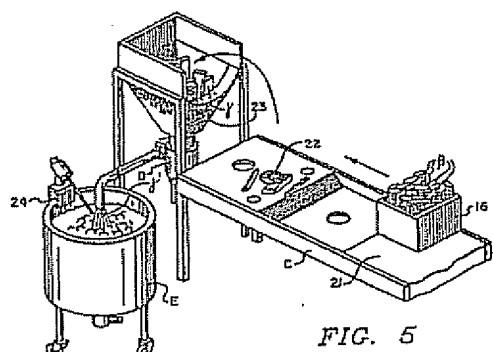


FIG. 5
フレットヒルビ道跡物の構造

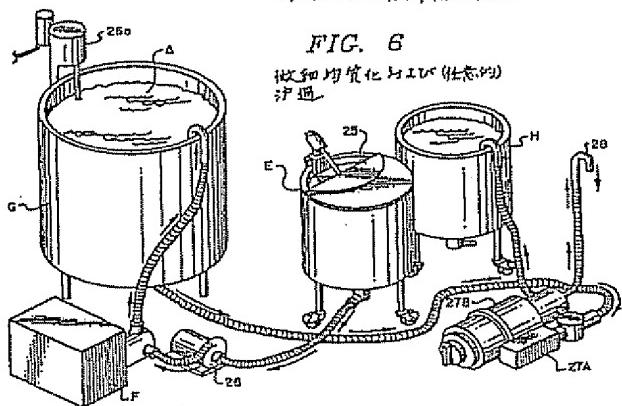


FIG. 6
微細均質化与工芸(性質的)
並圖

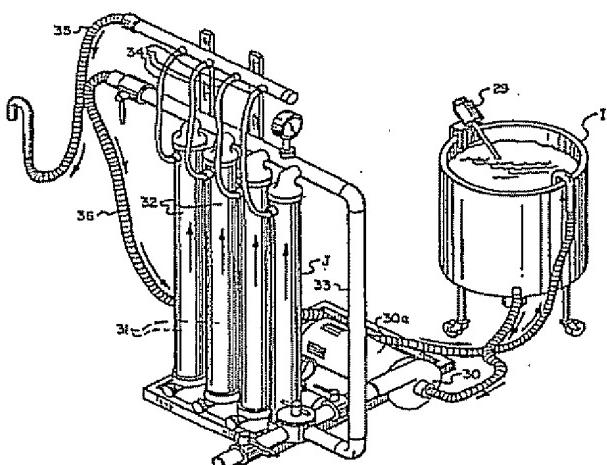


FIG. 7
造析装置

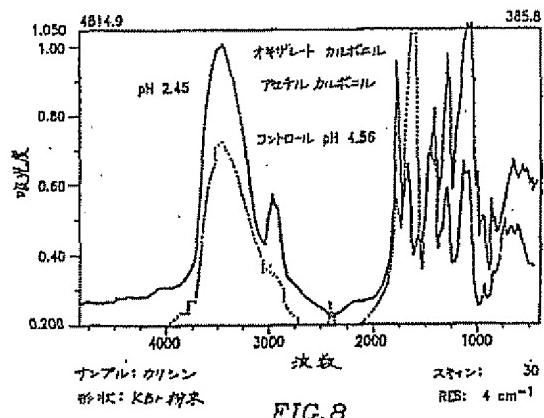


FIG. 8

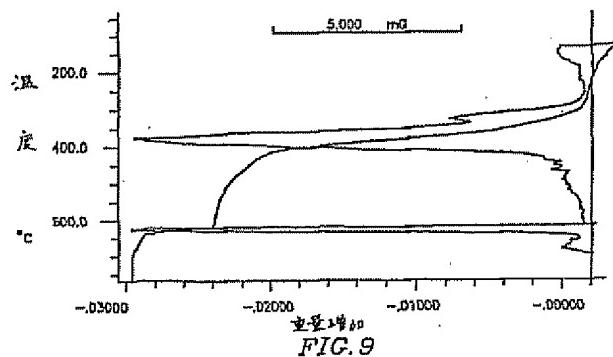


FIG. 9

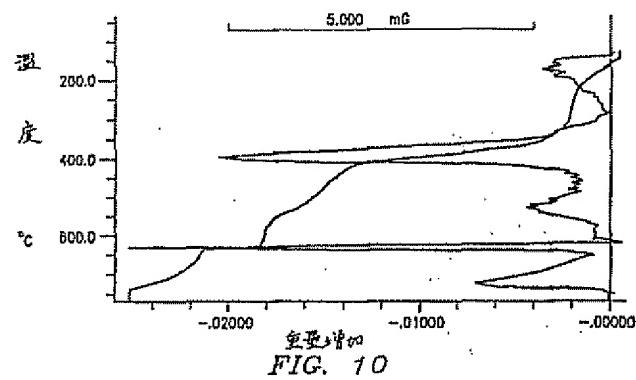
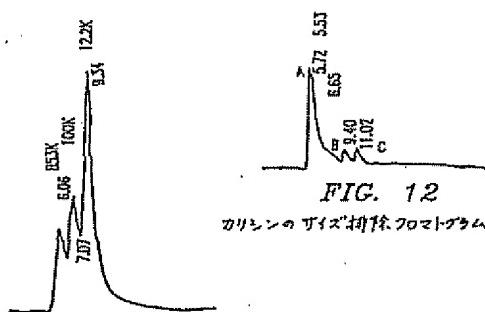
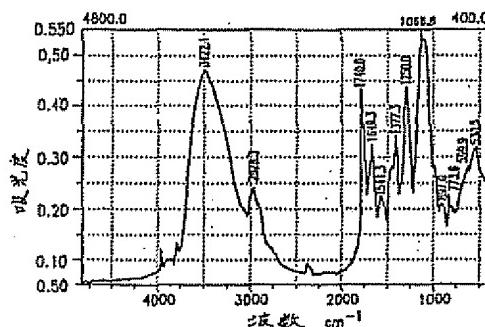
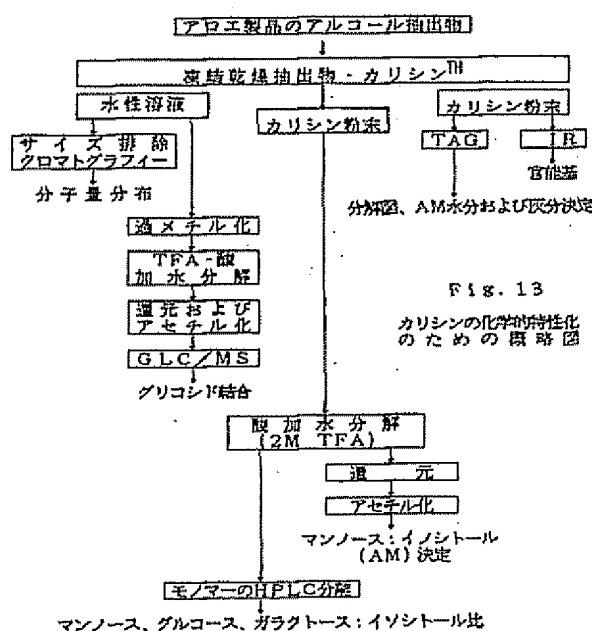
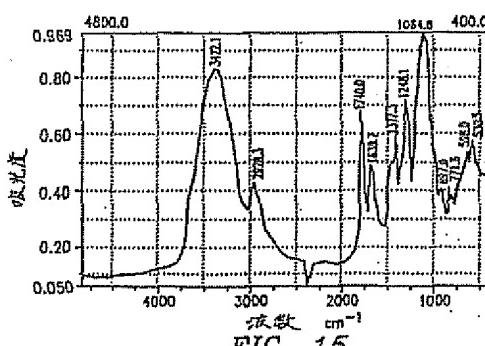


FIG. 10

FIG. 11
カリシンのサスペンションクロマトグラムFIG. 14
プロテアーゼ処理していないカリシンのIRスペクトルFIG. 15
プロテアーゼ処理したカリシンのIRスペクトル

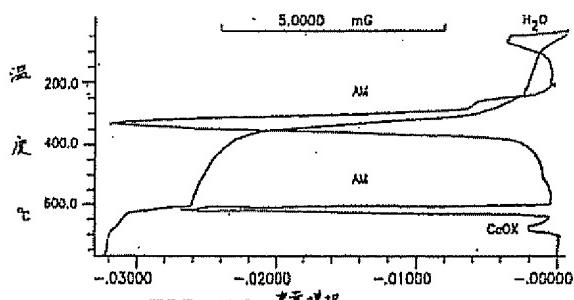


FIG. 16
カリシンのTGA吸収記録図

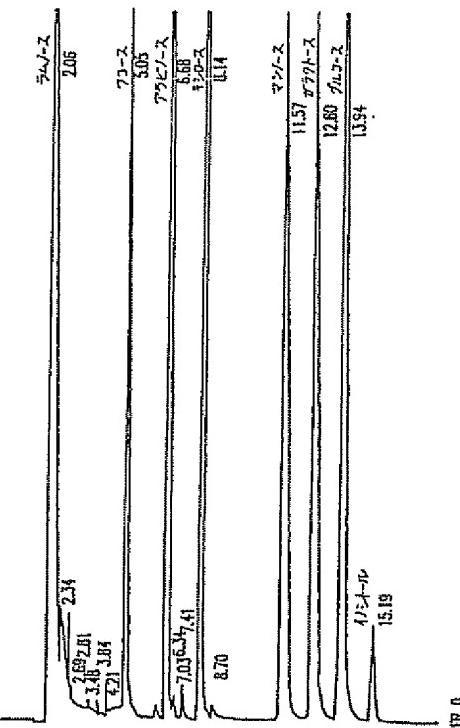
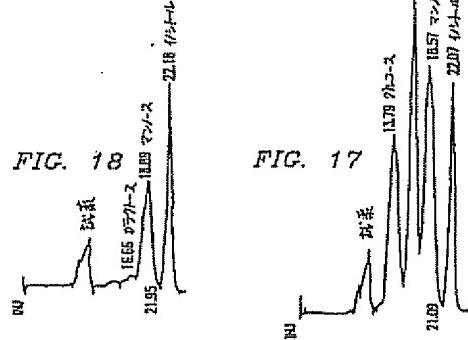


FIG. 19

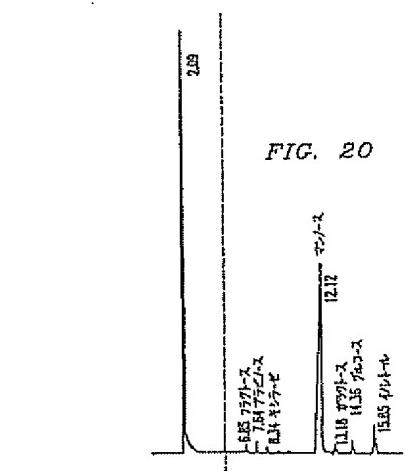


FIG. 20

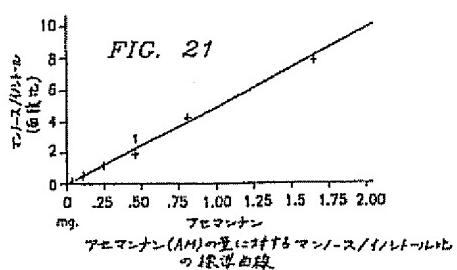
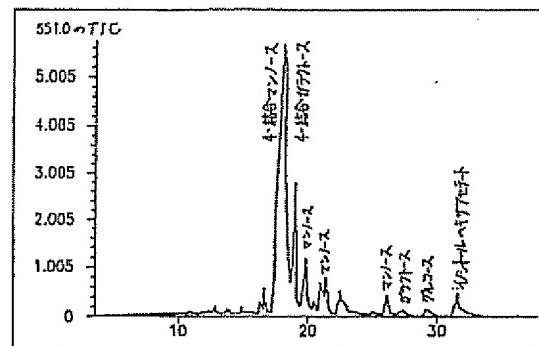


FIG. 21



カリシング部分約にメチル化し、カルボ部分約にアセチル化
レニクリシットールの脱イオンクロマトグラム(TIC)

FIG. 22

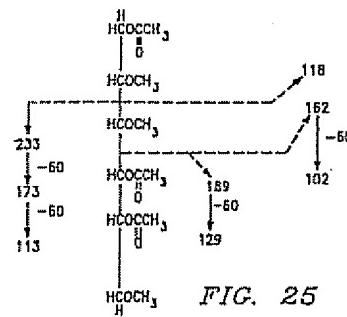


FIG. 25

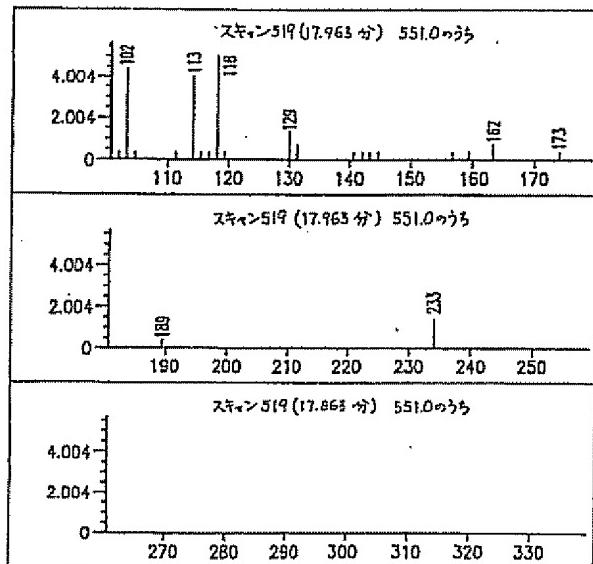


FIG. 23

1,4,5-トリ-O-アセチル-2,3,6-トリ-O-メチルマンニトール
(4-MANP-)のマススペクトル

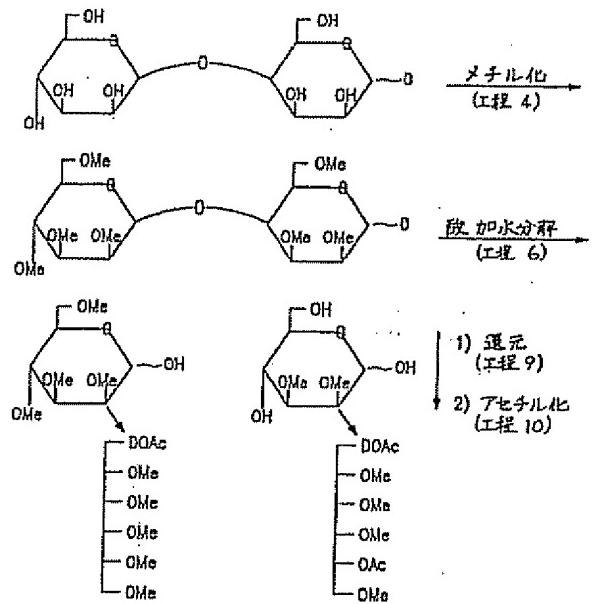


FIG. 24

部分的にメチル化したマニトールアセテート

International Application No. PCT/US85/00018		
Classification of Subject Matter in Several Standardized Fields, Serial Number A-1		
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IN SEVERAL STANDARDIZED FIELDS, SERIAL NUMBER A-1 IPC(4) + ASLEX 35/73, 31/73, C07E 1/00		
U.S. CT. I 424/195.1; 514/53 . 847, 824/DIG 13; 536/53, 123		
II. PAPER SEARCHER		
National Classification System I Classification System II		
B.B.	424/195.1; 514/53, 847, 824/DIG 13; 536/53, 123	
Documentation Received from Member DPA's to the Patent and Trademark Office		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE IRRELEVANT		
Category I	Code(s) of Document, or with indication, where appropriate, of the Standard practice	Reference to Clause No. II
A	US, A, 3,362,951 FARJAS 30 January 1968.	1-32
A	US, A, 3,692,853 COBBLE 01 July 1973	1-32
A	US, A, 4,555,087 TUNLINGTON 03 December 1985	1-32
A	US, A, 3,920,816 SEEGALL, 18 November 1975	1-32
A	US, A, 4,178,372 COATS 11 December 1979	1-32.
IV. CERTIFICATION		
Date of the First Consideration of the International Search	Date of Making of the International Search Report	
06 April 1988	11 MAY 1989	
International Searching Authority ITA/US	International Preliminary Examining Authority John H. COLLINS Jr.	

第1頁の続き

⑤Int. Cl.^{*}
A 61 K 7/42
35/78

識別記号	序内整理番号
A B F	6971-4C
A C A	
A C L	
A C Q	V 8413-4C
A D T	
A D Z	